

GENEXPRESSIONSPROFIL UND
AKTIVITÄT HUMANER PAPILLOMVIREN
IN NICHT-MELANOZYTÄREN HAUTTUMOREN

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Chantip Dang-Heine, geb. Dang

geb. am 21.04.1976 in Battambang

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter : 1. Prof. Dr. Wolfgang Uckert
2. PD Dr. Ingo Nindl
3. PD Dr. Reinhard Wanner

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Januar 2010

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Hauttumorzentrum (HTTC) der Charité, Universitätsmedizin Berlin, in der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. Ingo Nindl angefertigt. Allen Kollegen dieses Instituts, mit denen ich zusammengearbeitet habe, bin ich zu Dank verpflichtet.

Besonders herzlich möchte ich mich für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei Herrn PD Dr. Ingo Nindl bedanken, der mir das Thema dieser Arbeit zur Verfügung gestellt und mich betreut hat.

Bei Herrn Dr. Marc Gottschling bedanke ich mich herzlich für die wissenschaftliche Unterstützung, sowie für das Lesen und Korrigieren des Manuskriptes.

Dr. Anja Köhler, Mandy Lehmann und Kathi Westphal danke ich für die herzliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe und die wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft. Für das Lesen und Korrigieren des Manuskripts bedanke ich mich bei Dr. Anja Köhler, Karen Meusemann und Dr. Sandra Artinger.

Ganz herzlicher Dank gilt meiner Familie und im Besonderen meinem Mann Guido, meinem Sohn Max und meiner Tochter Mali für die liebevolle Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Uckert für seine freundliche Bereitschaft bedanken, diese Arbeit zu betreuen.

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
 ZUSAMMENFASSUNG.....	 1
ABSTRACT.....	2
 1 EINLEITUNG.....	 3
1.1 Kutanes Plattenepithelkarzinom (SCC).....	3
1.2 Aufbau der Haut.....	4
1.3 Karzinogenese als multifaktorieller Prozess	5
1.4 Differenzielle Genexpression in SCC.....	7
1.5 Tenascin-C (Tn-C) als potentieller Früherkennungsmarker	9
1.6 Humane Papillomviren (HPV)	12
1.7 Rolle von HPV bei der Entstehung von nicht-melanozytärem Hautkrebs (NMSC).....	14
1.8 Zielsetzung	16
2 MATERIAL.....	17
2.1 Patientenproben.....	17
2.2 Reagenzien und Zelllinien	20
2.2.1 Reagenzien	20
2.2.2 Antikörper	21
2.2.3 Enzyme.....	21
2.2.4 Größenmarker	21
2.2.5 Zelllinien	21
2.3 Medien, Lösungen und Puffer	22
2.3.1 Medien für die Zellkultur.....	22
2.3.2 Puffer und Lösungen.....	22
2.4 Reagenzsysteme (Kits).....	23
2.5 Verwendete Geräte.....	23
2.6 Synthetisch hergestellte Nukleinsäuren.....	24
3 METHODEN.....	28
3.1 Zellkultur	28
3.2 Isolation von Nukleinsäuren	28
3.2.1 RNA-Isolation aus Zelllinien.....	28
3.2.2 RNA-Isolation aus Biopsien.....	28
3.2.3 DNA-Isolation aus Biopsien.....	29
3.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	29
3.3.1 RNA-Quantifizierung	29

3.3.2 cDNA-Quantifizierung	29
3.4 Synthese von cDNA.....	30
3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
3.6 Agarosegelelektrophorese.....	32
3.7 DNA-Sequenzierung.....	32
3.8 Southern Blot.....	33
3.8.1 Herstellung DIG-markierter Sonden für die Southern-Hybridisierung.....	33
3.8.2 Southern Blot	34
3.9 Reverse Line Blot (RLB) zur HPV-Typisierung	34
3.9.1 Methodik des RLB.....	34
3.9.2 Kopplung der HPV-Sonden.....	35
3.9.3 <i>Beta-Gamma-Cutaneous</i> -PCR (BGC-PCR)	36
3.9.4 Reverse Line Blot (RLB).....	37
3.10 Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Microarray-Technologie.....	38
3.10.1 Grundlagen der cDNA-Microarray-Analysen	38
3.10.2 Auswahl und Prozessierung der Patientenproben.....	39
3.10.3 Statistische Auswertung der cDNA-Microarray-Analysen	40
3.11 Relative Quantifizierung der RNA-Expression	41
3.11.1 Methodik der quantitativen <i>real-time</i> RT-PCR (qPCR).....	41
3.11.2 Oligonukleotide für die qPCR	43
3.11.3 Versuchsaufbau der qPCR.....	43
3.11.4 Optimierung der qPCR	45
3.11.5 Relative Quantifizierung mittels qPCR.....	45
3.11.6 Statistische Auswertung der qPCR.....	46
3.12 Immunhistologische Methoden	46
3.12.1 Färbung mit Hämatoxylin und Eosin	46
3.12.2 Immunhistochemische Färbung von humanen Geweben.....	47
4 ERGEBNISSE	49
4.1 Identifikation differenziell regulierter Gene in kutanen SCC.....	49
4.2 Verifizierung der Genexpressionsanalyse mittels qPCR	52
4.2.1 Quantifizierung differenziell hochregulierter Gene in SCC	52
4.2.2 Quantifizierung differenziell herunterregulierter Gene in SCC	54
4.2.3 Quantifizierung der mRNA-Expression von MMP1 und RAB31 in den Entwicklungsstadien von SCC.....	56
4.3 Expression von Tn-C und dessen Spleißvarianten in SCC.....	58
4.3.1 Quantifizierung der Tn-C mRNA-Expression mittels qPCR	58
4.3.2 Untersuchung von Tn-C Spleißvarianten.....	59
4.3.3 Southern Blot-Analyse der Tn-C Spleißvarianten	60
4.3.4 Sequenzierung der Tn-C Spleißvarianten	61
4.3.5 Immunhistologischer Nachweis von Tn-C.....	62
4.4 Nachweis und Aktivität von HPV in NMSC	65

4.4.1 Nachweis von HPV-Typen mittels RLB.....	65
4.4.2 Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von HPV.....	68
4.4.3 Variantenanalyse der nachgewiesenen HPV E6/E7-Gene	70
5 DISKUSSION.....	72
5.1 Differenziell regulierte Gene in SCC	72
5.2 Charakterisierung von SCC-assoziierten Genen.....	74
5.2.1 Hochregulierte Gene in SCC	74
5.2.2 Herunterregulierte Gene in SCC.....	77
5.3 Funktionelle Bedeutung der identifizierten Gene in SCC	79
5.4 Tn-C als SCC-Früherkennungsmarker	81
5.4.1 Analyse der Expression von Tn-C in SCC.....	81
5.4.2 Expression von Tn-C Spleißvarianten in SCC.....	82
5.5 Untersuchungen von HPV-Transkripten in SCC	84
5.5.1 HPV-Infektion in SCC.....	84
5.5.2 HPV E6/E7-Aktivität in SCC	85
5.5.3 HPV-Infektion von SCC mit Varianten von HPV 9 und 15.....	87
6 LITERATURVERZEICHNIS	89
7 ERKLÄRUNG	98
8 PUBLIKATIONEN	99
9 ANHANG	100

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Aufbau der menschlichen Haut..	5
Abbildung 2:	Multifaktorielle Karzinogenese eines kutanen Plattenepithelkarzinoms (SCC).	6
Abbildung 3:	Schematische Darstellung einer Microarray-Analyse.....	8
Abbildung 4:	Schematische Darstellung von Tn-C mit seinen Domänen und als Hexamer.....	10
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der Tn-C-Spleißregion in der Fibronectin III-Domäne..	11
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des HPV8-Genoms.	13
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der HPV-Typisierung.	35
Abbildung 8:	Einlagerung von SYBR Green I [®] in die neu gebildete DNA.	41
Abbildung 9:	Beispiel einer Amplifikationskurve einer qPCR mit dem LightCycler [®]	42
Abbildung 10:	Hierarchische Clusteranalyse der differenziell exprimierten Gene.	50
Abbildung 11:	Funktionelle Gliederung von 118 in SCC differenziell regulierten Genen.	51
Abbildung 12:	Expressionsrate der hochregulierten Gene mittels qPCR..	52
Abbildung 13:	Expressionsrate der herunterregulierten Gene mittels qPCR.....	54
Abbildung 14:	Expressionsrate von <i>MMP1</i> und <i>RAB31</i> mittels qPCR	56
Abbildung 15:	Expressionsrate des <i>Tn-C</i> -Gens.	58
Abbildung 16:	Expression von <i>Tn-C</i> Spleißvarianten in SCC, AK versus normale Haut.	59
Abbildung 17:	Southern Blot-Analyse zur Bestätigung der Spezifität der PCR-Produkte.	60
Abbildung 18:	Schematische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse.	61
Abbildung 19:	Immunhistologische Färbung von Tn-C in normaler Haut.....	62
Abbildung 20:	Immunhistologische Färbung von Tn-C von AK.....	63
Abbildung 21:	Immunhistologische Färbung von Tn-C von SCC-Gewebe.....	64
Abbildung 22:	Reverse Line Blot (RLB) HPV-Typisierung.....	66
Abbildung 23:	Transkriptionelle Aktivität von <i>HPV8 E6/E7</i>	69
Abbildung 24:	Ausschnitt eines Chromatogramms nach Sequenzierung.....	69
Abbildung 25:	Variantenanalyse des nachgewiesenen <i>HPV9 E6</i> -Gens.....	70
Abbildung 26:	Aminosäuresequenzvergleich der Probe 1T mit dem Prototyp (Pro).....	71
Abbildung 27:	Schematische Darstellung der verifizierten, differenziell regulierten Gene einer repräsentativen SCC-Zelle.....	79

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Hautproben von 5 SCC-Patienten und 5 immunkompetenten Kontrollen für die cDNA-Microarray-Analysen	17
Tabelle 2:	Hautproben der 6 NMSC-Patienten für die HPV-Analysen	19
Tabelle 3:	Synthetisch hergestellte Oligonukleotide der Kandidatengene für die qPCR	25
Tabelle 4:	Synthetisch hergestellte Oligonukleotide zur HPV-Expressionsanalyse mittels qPCR.	26
Tabelle 5:	Synthetisch hergestellte Oligonukleotide zur Tn-C Spleißanalyse mittels PCR	27
Tabelle 6:	Vergleich der Daten differenziell hoch exprimierter Gene zwischen SCC und normaler Haut von cDNA-Microarray und qPCR.	53
Tabelle 7:	Vergleich der Genexpression herunterregulierter Gene in SCC-Gewebe verglichen mit normaler Haut und Vergleich der Daten von cDNA-Microarray und qPCR.	55
Tabelle 8:	Vergleich der Daten differenziell exprimierter Gene zwischen SCC und normaler Haut von cDNA-Microarray und qPCR	57
Tabelle 9:	Nachweis kutaner HPV-Typen mittels Reverse Line Blot (DNA) und qPCR (RNA).	67
Tabelle 10:	Hautproben von SCC-Patienten für die Tn-C-Analysen	100
Tabelle 11:	Funktion und Expression der in SCC differenziell regulierten Gene	102

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Aktinische Keratose
AS	Aminosäure
BCC	Basal Cell Carcinoma
BGC-PCR	Beta (β)-Gamma (γ)-Cutaneous Polymerase Chain Reaction
bp	Basenpaar
DNA	deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
EDAC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide
EDTA	Ethylendiamintetra-Acetat
et al.	und andere
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HPV	Humanes Papillomvirus
kb	Kilobasenpaare (10 ³ Basenpaare)
l	Liter
min	Minuten
NMSC	Non Melanoma Skin Cancer
Nt	Nukleotid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphat Buffered Saline
qPCR	quantitative <i>real-time</i> RT-Polymerase Chain Reaction
RLB	Reverse Line Blot
RNA	ribonucleic acid/ Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
TAE	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
Tn-C	Tenascin-C
sec	Sekunde
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SDS	Sodiumdodecylsulfat
U	Unit - Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
w/v	Gewichts-Volumenverhältnis

Einheiten des Internationalen Einheitensystem (SI, Le Système international d'unités) wurden nach geltendem Gesetz verwendet.

ZUSAMMENFASSUNG

Für die Entstehung nicht-melanozytärer Hauttumore sind mehrere Risikofaktoren verantwortlich: UV-Exposition, Pigmentierung, Alter, Immunsuppression und möglicherweise Humane Papillomviren (HPV). Die molekularen Mechanismen der Tumorgenese des kutanen Plattenepithelkarzinoms (SCC) sowie der Präkanzerose Aktinische Keratose (AK) sind nur lückenhaft bekannt. Fokus dieser Arbeit ist die Untersuchung von SCC-Genexpressionsprofilen sowie der Einfluss kutaner HPV-Typen während der Karzinogenese bei immunkompetenten und immunsupprimierten, organtransplantierten Patienten.

Durch Genexpressionsanalyse kutaner SCC, AK und normaler Haut konnten 118 differenziell exprimierte Gene in SCC mittels cDNA-Microarrays identifiziert werden. Bestätigt wurde die Expression von 11 aus 13 ausgewählten Genen (85%) mittels quantitativer *real-time* RT-PCR (qPCR), dabei konnte eine Korrelation der Genexpression mit der Progression der AK zum SCC für 3 Gene nachgewiesen werden. Dazu zählen das Gen Metalloproteinase-1, kodierend für ein Enzym, das in den Umbau von extrazellulärer Matrix involviert ist, das Protoonkogen RAB31 und das Tenascin-C (Tn-C) kodierende Gen Tn-C. Tn-C war im SCC-Gewebe an der Invasionsfront in Basalzellen sowie Keratinozyten im *Stratum papillare* und *retikulare* als Protein nachweisbar, nicht aber in normaler Haut. Die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig nachgewiesene 2243 bp-Spleißvariante von Tn-C könnte aufgrund der primären Expression in SCC-Gewebe als diagnostischer Marker für SCC dienen. Diese Daten zeigen, dass simultane, multifaktorielle Dysregulationen von Genexpression und DNA-Reparatur, Zellzyklus und Proliferation, proteolytischen Enzymen und Adhäsionsmolekülen in SCC vorliegen.

Ferner wurde die Expression von HPV in SCC und damit der kausale Zusammenhang einer HPV-Infektion mit der Hauttumorgenese untersucht. Das Infektionsmuster von SCC-Gewebe und normaler Haut mit spezifischen HPV-Typen erfolgte durch den Nachweis typenspezifischer HPV-DNA. Virale E6/E7-mRNA-Transkripte der kutanen HPV-Typen 8, 9 und 15 wurden in AK und SCC nachgewiesen. Dagegen konnten in HPV-DNA positiver, gesunder Haut oder Warzen keine HPV-Transkripte gefunden werden. Die Variantenanalyse des offenen Leserahmens von E6 identifizierte eine einzelne, bislang nicht beschriebene Punktmutation mit nicht bekannter Veränderung der Proteinstruktur. Die virale Aktivität der Onkogene E6 und E7 einiger kutaner Typen in AK und SCC weisen auf eine mögliche Rolle von HPV bei der kutanen Hautkarzinogenese hin.

ABSTRACT

During development of nonmelanoma skin cancer, several risk factors are involved: UV-exposition, pigmentation, age, and potentially human papilloma virus (HPV). The molecular mechanisms underlying tumourgenesis in squamous cell carcinoma (SCC) and its pre-cancerous actinic keratosis (AK) are not fully understood. In this study, the gene expression profile and HPV-infection status were analysed in SCC from immunocompetent and organ transplanted, immunocompromised patients.

By global transcriptome analysis from cutaneous SCC, AK and healthy skin, 118 genes were identified differentially expressed in a cDNA-microarray. The expression of 11 out of 13 selected genes (85%) was investigated by *real-time* RT-PCR (qPCR) and the expression of three genes remarkably induced in SCC correlated with the progression to AK until SCC. These genes encoded for *Metalloproteinase-1*, which is involved in the remodelling of extracellular matrix, and the protooncogene *RAB31* and *Tenascin-C* (*Tn-C*). Tn-C protein is expressed in SCC-tissue at the invasion front in basal cells and in keratinocytes in the *Stratum papillare* and *reticulare*, but not in healthy skin. This study, the 2243 bp *Tn-C*-specific splice-variant has for the first time detected in SCC, but not in normal skin. Thus it might serve as diagnostic marker of SCC progression. The data of the transcriptome analysis indicates that a simultaneous dysregulation of oncogene expression and DNA-repair, cell-cycle and proliferation, proteolysis and adhesion molecules exists in SCC.

Additionally, the expression of HPV in SCC and thus the causal relationship between HPV-infection and tumourgenesis of SCC in immunocompromised patients was investigated. The HPV-infection pattern in SCC-tissue and normal skin was assessed by detection of DNA from cutaneous HPV-types. Viral E6/E7-mRNA-transcripts of the cutaneous HPV-types 8, 9, 15 were expressed selectively in AK and SCC. In contrast, no HPV-specific mRNA was present in HPV-DNA positive normal skin. The analysis of the open reading frame from the respective E6-protein genes unravelled one single pointmutation, which is not been characterized so far in terms of e.g. its impact on protein structure. The viral activity of the oncogenes E6 and E7 of cutaneous HPV-types indicates a potential function of HPV in the tumourgenesis of SCC in immunocompromised individuals.

1 EINLEITUNG

1.1 KUTANES PLATTENEPITHELKARZINOM (SCC)

Maligne Tumore der Haut sind in der kaukasischen Bevölkerung die häufigsten Krebserkrankungen (Corona, 1996; de Gruijl, 1999; Euvrard *et al.*, 2003). Sie werden in zwei systematische Familien unterteilt: die Melanome und die Tumore vom nicht-melanozytären Typ (engl. *nonmelanoma skin cancer*, NMSC; epithialer Hautkrebs). Derzeit beträgt die Inzidenz¹ von NMSC 1.000.000 Neuerkrankungen/Jahr in den USA (Jemal *et al.*, 2005) und 100.000 Neuerkrankungen/Jahr in Deutschland (Katalinic *et al.*, 2003). Weltweit waren innerhalb der letzten zehn Jahre 30% aller diagnostizierten Karzinome NMSC (Diepgen and Mahler, 2002; Gloster and Brodland, 1996). NMSC lässt sich in Basalzellkarzinome (*basal cell carcinoma*, BCC) und Plattenepithelkarzinome (*squamous cell carcinoma*, SCC) unterteilen, die die Frühformen Aktinische Keratosen (AK) und Morbus Bowen (MB) einschließen (Nindl *et al.*, 2007). Nach den BCC sind SCC die zweithäufigsten kutanen Malignome in der kaukasischen Bevölkerung der USA (Chen *et al.*, 2001).

Aktinische Keratosen (AKs) sind intraepitheliale Karzinome. Sie entstehen meist in chronisch sonnenexponierter Haut besonders bei gering pigmentierten Menschen von über 45 Jahren (Fu and Cockerell, 2003). Etwa 10% aller AK entwickeln sich zu SCC (Fu and Cockerell, 2003), doch häufig erfolgt dies erst nach Jahren infolge von Proliferation und infiltrativ-destruierendem Wachstum der atypischen Zellen.

Das SCC ist ein von den Keratinozyten ausgehender invasiv wachsender Tumor mit früher, lymphogener Metastasierung. Die aus den Keratinozyten des *Stratum spinosum* entstehenden Tumorzellen ordnen sich zu unregelmäßig großen Nestern mit deutlichen Kern- und Zellatypien an. Eine starke Verhornung zeigt einen hohen Differenzierungsgrad, fehlende Verhornung korreliert mit einer Entdifferenzierung der Zellen und damit einer schlechten Prognose des Krankheitsverlaufs. Die Morbidität liegt in Mitteleuropa bei sechs bis zwölf Fällen pro 100.000 Einwohner, in sonnenreichen Ländern, die innerhalb der letzten

¹ Inzidenz = Anzahl der Neuerkrankungen in einer Population (z.B 100.000 Einwohner) pro Jahr

Jahrhunderte von weißen Europäern besiedelt wurden, allerdings noch wesentlich höher (beispielsweise Australien mit 50 Fällen pro 100.000 Einwohner) (Staples *et al.*, 2006). In einer Studie von 1994 wurde die Wahrscheinlichkeit an SCC zu erkranken auf 7-11% geschätzt (Miller and Weinstock, 1994). Die Inzidenz ist seit den 1960er Jahren drastisch angestiegen. Die jährliche Zunahme der Inzidenz von NMSC wurde für die hellhäutige Bevölkerung in Europa, den USA, Kanada und Australien auf 3-8% geschätzt (Diepgen and Mahler, 2002; Gloster and Brodland, 1996; de Vries *et al.*, 2006). So ist beispielsweise in New Hampshire (USA) im Zeitraum von 1979/1980 bis 1993/1994 bei Männern eine Zunahme von 235% (25,8 auf 93,1 Fälle pro 100.000 Einwohner) und bei Frauen von 350% (9,3 auf 44,9 Fälle pro 100.000 Einwohner) festgestellt worden (Karagas *et al.*, 1999).

1.2 AUFBAU DER HAUT

Als äußerer Mantel schützt die menschliche Haut den Körper vor chemischen und physikalischen Noxen sowie vor dem Befall durch Pathogene. Sie besitzt eine komplexe Struktur, wobei sie sich von außen nach innen in Oberhaut (*Epidermis*), Lederhaut (*Dermis*) und Unterhaut (*Subcutis*) gliedert (s. Abbildung 1). *Epidermis* und *Dermis* werden auch als *Cutis* bezeichnet und stellen die Lederhaut im eigentlichen Sinne dar.

Die Epidermis setzt sich aus folgenden fünf Schichten zusammen: Hornschicht (*Stratum corneum*), Glanzschicht (*Stratum lucidum*), Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*), Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*) und Basalschicht (*Stratum basale*) (s. Abbildung 1). Im *Stratum basale* befinden sich die Stammzellen der Keratinozyten, deren durch Mitose gebildeten Tochterzellen in die suprabasalen Keratinozytenschichten wandern. Diese mitotisch inaktiven Tochterzellen durchlaufen während ihres zwei- bis vierwöchigen Weges durch die Schichten der Epidermis eine regulierte, terminale Differenzierung, die in kernlosen Korneozyten (Hornzellen) im *Stratum corneum* endet.

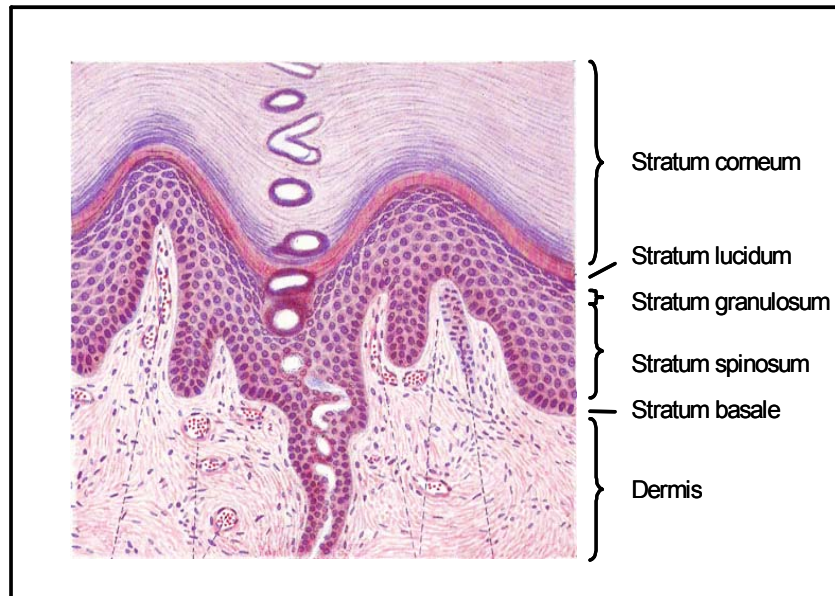


Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut. Schematische Darstellung von mit Hämatoxylin und Eosin gefärbter Fingerhaut (170-fach vergrößert, aus Wallraff, 1963).

Die Epidermis wird von der Dermis durch eine speziell differenzierte Suprastruktur des dermalen Bindegewebes, der Basalmembran, getrennt. Diese dient nicht nur als Verankerungs- und Verbindungsstruktur, sondern regelt auch Wachstum und Differenzierung der Zellen in der basalen Schicht der Epidermis. In der Dermis lassen sich zwei Schichten unterscheiden: die Papillarschicht (*Stratum papillare*) und die Geflechschicht (*Stratum reticulare*). Über die bindegewebigen Papillen des *Stratum papillare* ist die Dermis fest mit der Epidermis verzahnt. Im Hinblick auf die Entstehung und Lokalisation von Hauttumoren ist die Epidermis von entscheidender Bedeutung, da sie die äußerste Schutzschicht der Haut gegenüber Karzinogenen bildet und mitotisch aktive Zellen enthält.

1.3 KARZINOGENESE ALS MULTIFAKTORIELLER PROZESS

Derzeit wird ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren als kausal für die Karzinogenese der Haut angenommen. Als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von SCC werden UV-Strahlung in Abhängigkeit vom Hauttyp, Immunsuppression, genetische Prädisposition (insbesondere Pigmentierung) sowie Virusinfektionen diskutiert, z.B. mit bestimmten Humanen Papillomviren (HPV) (Harwood *et al.*, 1999), s. Abbildung 2. Man versteht die maligne Entartung in einer Zelle als eine Kette von genetischen Ereignissen, die

sich in einer veränderten Genexpression widerspiegelt. Allerdings wurden die Gene, die an der Entstehung und Progression von SCC beteiligt sind, bislang noch nicht vollständig identifiziert.

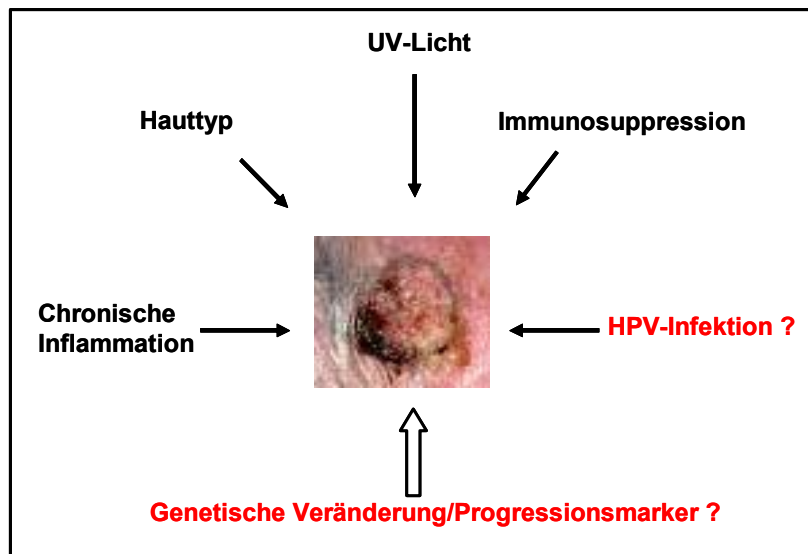


Abbildung 2: Multifaktorielle Karzinogenese eines kutanen Plattenepithelkarzinoms (SCC). Neben UV-Strahlung und dem Hauttyp spielen Faktoren wie Immunsuppression und chronische Inflammation eine Rolle während der Tumorgenese von SCC. Ob eine Infektion mit kutanen HPV sowie genetische Faktoren in die Tumorgenese involviert sind, ist Gegenstand dieser Arbeit (rot markiert).

Das hauptsächliche Auftreten von SCC an sonnenexponierten Stellen der Haut und der Nachweis von spezifischen, UV-induzierten DNA-Mutationen in diesen Tumoren zeigen, dass die Karzinogenese von SCC mit der UV-Exposition der Haut korreliert (Armstrong and Krickler, 2001). Die Bedeutung von UV-Strahlung für die Entwicklung von Tumoren spiegelt sich in einer erhöhten NMSC-Erkrankungsrate bei Patienten mit Erbkrankheiten der Haut wider, die eine erhöhte Sensitivität gegen UV-Strahlung besitzen, wie beispielsweise *Xeroderma pigmentosum* oder Albinismus (Jablonska and Majewski, 1994). Die hochenergetische UVB-Strahlung des Wellenlängenbereichs 280 bis 315 nm dringt durch die epidermalen Schichten bis ins *Stratum basale* ein. Die häufigsten Ziele für Mutationen sind Pyrimidin-Dimere in der DNA. Die UVB-induzierten Mutationen in der Haut finden alltäglich statt, doch besitzen Hautzellen hoch spezialisierte Schutzsysteme, durch welche DNA-Schäden aufgespürt und repariert werden. Bei nicht reparabler Schädigung durchlaufen die betroffenen Zellen normalerweise den programmierten Zelltod (Apoptose). Entziehen sich entartete Zellen in der Basalschicht dieser Kontrolle, sind die Voraussetzungen für die Entstehung eines SCC gegeben.

Neben UV-Strahlen gilt die Immunsuppression, z.B. bei organtransplantierten Patienten, als Hauptrisikofaktor für die Entstehung von NMSC (Ulrich *et al.*, 2003). Die Zahl der Organtransplantationen ist seit den Anfängen um 1950 weltweit stark gestiegen. Von 1963 bis 2006 wurden allein in Deutschland insgesamt 83.807 Organe verpflanzt, davon 4.646 im Jahr 2006 (DSO, 2007). Zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen werden die Organempfänger medikamentös systemisch immunsupprimiert. Etwa 40% der nierentransplantierten Patienten entwickeln innerhalb von 15 Jahren nach der Immunsuppression NMSC (Birkeland *et al.*, 1995); diese Krebsform stellt die häufigste Erkrankung als Folge von Organtransplantationen dar. Moloney und Kollegen (2006) konnten eine signifikante Häufung von NMSC bei nierentransplantierten Patienten beobachten. Patienten mit Herztransplantation benötigen eine stärkere Immunsuppression verglichen mit Patienten mit Lebertransplantation und analog dazu ist die Inzidenz von NMSC dreimal häufiger (Cassarino *et al.*, 2006). So besteht ein Zusammenhang zwischen transplantiertem Organ und dem Ausmaß der Immunsuppression und damit auch der Entstehung von NMSC (Jensen *et al.*, 1999).

1.4 DIFFERENZIELLE GENEXPRESSION IN SCC

Das humane Genom umfasst 30.000 – 40.000 verschiedene Gene (Venter *et al.*, 2001; Lander *et al.*, 2001). Aufgrund restriktiver Regulations- und Kontrollmechanismen werden jedoch nur etwa 10 – 15% aller Gene in einer Zelle exprimiert. Die Genexpressionskontrolle wird durch Lebensprozesse wie Entwicklung, Differenzierung, Homöostase, Zellzyklusregulation, Alterung oder Zelltod bestimmt. In pathologischen Prozessen kommt es zu charakteristischen Veränderungen des Genexpressionsprofils der Zelle. So sind, verglichen mit normalem Gewebe, ca. 700 verschiedene Gene in Brustkrebs differenziell reguliert und exprimiert (Martin *et al.*, 2000). Eine vergleichbare Anzahl von unterschiedlich exprimierten Genen wurde in anderen Tumoren wie Mamma-, Ovar- oder Kolonkarzinomen gefunden (Alon *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997).

Die Gesamtheit der exprimierten Gene wird als Transkriptom bezeichnet. In einer globalen Transkriptomanalyse werden zwei oder mehr verschiedene Transkriptome miteinander verglichen, auf diese Weise können differenziell exprimierte Gene identifiziert werden. Zur Erfassung des Transkriptoms bietet sich die cDNA-Microarray-Technologie an. Eine Übersicht der Verfahrensweise ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Bei dieser Technologie werden einzelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (DNA)-Oligonukleotide mit einer Basenpaarlänge

von 20-25 Basenpaaren als Sonden auf einer festen Oberfläche fixiert. Durch die Eigenschaft einzelsträngiger Nukleinsäuremoleküle, nur eine komplementäre DNA-Oligonukleotidsequenz spezifisch zu binden, kann eine hohe Spezifität der Hybridisierung mit markierten DNA-Oligonukleotiden erreicht werden. Der Fluoreszenz-basierte Nachweis der markierten DNA-Oligonukleotide ermöglicht eine Genexpressionsanalyse.

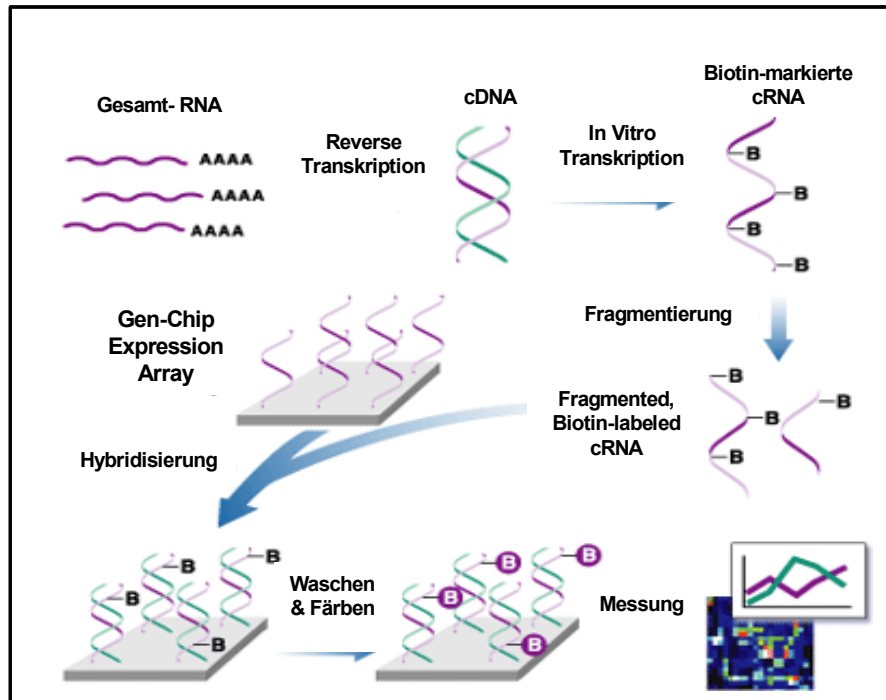


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Microarray-Analyse. Die revers transkribierte cDNA wird *in vitro* in Biotin-markierte cRNA umgeschrieben und nach Hitze-fragmentierung mit dem cDNA-Chip hybridisiert und anschließend über Fluoreszenzsignal nachgewiesen. Modifiziert nach <https://www.vbi.vt.edu/ezimagecatalogue/catalogue/phpOTGEoL.jpg>.

Um alternative, kausale Therapieformen der Behandlung von NMSC zu entwickeln, ist es notwendig, die molekularen Grundlagen der Tumorentstehung aufzuklären. Die Gene, die ein verändertes Expressionsverhalten in AK oder SCC im Vergleich zu normaler Haut aufweisen, gelten als potentielle Kandidatengene. Diese dienen zur Entwicklung von Strategien, um die Entstehung bzw. den Bestand der Plattenepithelkarzinome einzudämmen oder zu verhindern.

Bislang konnten erst wenige Gene in diesem Kontext identifiziert werden. Eine globale Transkriptomanalyse von SCC wurde bislang durch den Vergleich von primären Keratinozyten mit SCC-Zelllinien mittels cDNA-Microarray-Analysen durchgeführt (Dazard *et al.*, 2003).

Allerdings weisen *in vitro* SCC-Zelllinien wenig Übereinstimmung mit *in vivo*-Untersuchungen von SCC auf (Alon *et al.*, 1999; Ismail *et al.*, 2000). Lediglich in einer weiteren Studie wurde das Transkriptom von humanen NMSC-Biopsien (3 SCC) mit SCC-Zelllinien und normaler Haut verglichen (Dooley *et al.*, 2003). Dabei wurden 7.400 Gene auf einem DNA-Microarray untersucht, jedoch konnten nur 5 Gene sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bestätigt werden: Fibronectin 1, Annexin A5, Glyceraldehyde-3-phosphat-dehydrogenase, Zinkfingerprotein 254 und das Huntington-associated-protein-interacting-protein (HAPIP).

1.5 TENASCIN-C (Tn-C) ALS POTENTIELLER FRÜHERKENNUNGSMARKER

Tenascin-C (Tn-C) ist eine Komponente der extrazellulären Matrix (ECM) und gehört zu der Tenascin-Glykoprotein-Familie. Das Protein wurde in Zusammenhang mit Geweberegeneration und initialen, proliferativen Phasen gebracht (Erickson and Bourdon, 1989). Man findet es in malignen Tumoren, zu Beginn der dermalen Wundheilung und in embryonalem Gewebe (Erickson and Bourdon, 1989). Darüber hinaus wird Tn-C im Nerven- und Gefäßsystem sowie in Bindegewebskomponenten zahlreicher Organe exprimiert, insbesondere während der Entwicklungsphasen oder pathologischen Vorgängen. Als mögliche biologische Funktionen von Tn-C werden Zelladhäsion, Migration und Angiogenese diskutiert (Jones and Jones, 2000; Orend and Chiquet-Ehrismann, 2000). Auch eine wechselseitige Regulation mit extrazellulären Matrix Metalloproteinasen (MMPs) konnte beobachtet werden (Nagase and Woessner, 1999).

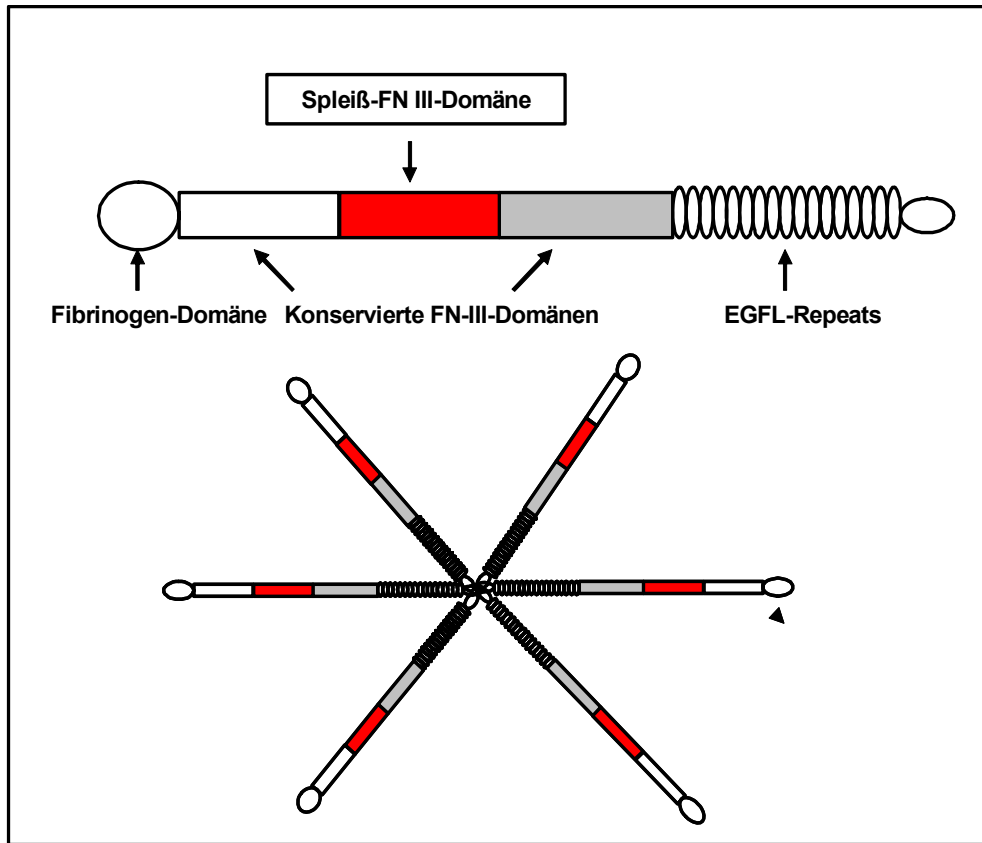


Abbildung 4: Schematische Darstellung von Tn-C mit seinen Domänen und als Hexamer. Tn-C besitzt am C-Terminus eine Fibrinogen-Domäne. N-terminal ist eine epidermal growth factor like-Domäne lokalisiert und dazwischen befindet sich eine Fibronectin-III Domäne (modifiziert nach Jones and Jones, 2000).

In Abbildung 4 ist das hexamere Molekül Tn-C schematisch dargestellt. Seine sechs Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 190 bis 230 kDa sind über Disulfid-Brücken miteinander verbunden und zu einem Komplex mit einer molekularen Masse von 1200 kDa zusammengefasst (Chiquet-Ehrismann *et al.*, 1991; Chiquet *et al.*, 1991). Jede Untereinheit besitzt drei unterschiedliche Domänen. Am N-Terminus befindet sich eine so genannte „epidermal growth factor like“-Domäne (EGF), in der Mitte die Fibronectin Typ III (TNCfn)-Domäne und am C-Terminus die Fibrinogen-Domäne, welche mit anderen ECM-Proteinen interagiert (Jones *et al.*, 1988). Tn-C wird in unterschiedlichen Gewebetypen räumlich und zeitlich getrennt exprimiert. Nach der Transkription wird die prä-mRNA zwischen TNCfn5 und TNCfn6 abhängig von ihrer biologischen Funktion alternativ gespleißt. Dadurch entstehen aus einer prä-mRNA verschieden reife mRNAs, die sich durch die Anzahl der kombinierten Exons unterscheiden. Das 190 kDa Tn-C Transkript spielt eine Rolle im Aufbau der ECM, während das 220 kDa große Transkript an der Zellmigration beteiligt ist (Prieto *et al.*, 1990).

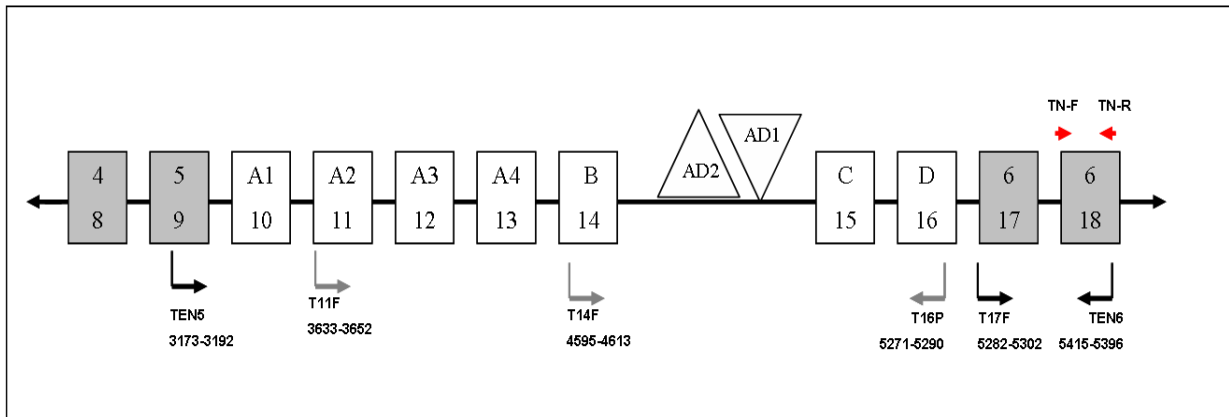


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Tn-C-Spleißregion in der Fibronectin III-Domäne. In den grauen Boxen sind die konservierten Exons und in den weißen Boxen die Exons, die alternativ gespleißt werden können, dargestellt. Die Pfeile über den Boxen symbolisieren die in dieser Arbeit verwendeten *real-time* mRNA PCR-Oligonukleotide und die unteren Pfeile stellen die Oligonukleotide zur Untersuchung der Spleißvarianten dar (modifiziert nach Adams *et al.*, 2002).

Eine Beteiligung von Tn-C an der Tumorgenese wird vermutet, da in verschiedenen malignen Tumoren eine erhöhte Expression beobachtet wurde, unter anderem in Brustkrebs- (Jones, 2001), Darmkrebs- (Emoto *et al.*, 2001; Riedl *et al.*, 1997) und Gehirntumorgewebe (Korshunov *et al.*, 2000). Erstmals zeigten Borsi *et al.* (1992) spezifische Tn-C Isoformen in Brustkrebszellen, die später in anderen Tumoren wie Schilddrüsenkrebs (Tseleni-Balafouta *et al.*, 2006) und oralem Plattenepithelkarzinom (Hindermann *et al.*, 1999) nachgewiesen werden konnten. In malignen Hauttumoren wie BCC und malignen Melanomen (Latijnhouwers *et al.*, 2000) wurden spezifische Spleißvarianten von Tn-C nachgewiesen.

1.6 HUMANE PAPILLOMVIREN (HPV)

Humane Papillomviren infizieren das mehrschichtige Plattenepithel des Menschen und bedingen je nach Virustyp verschiedene benigne oder maligne Hautveränderungen wie Hautwarzen, Zervixpapillome oder -karzinome (Shah *et al.*, 1996). Sie sind wirts- und gewebe-spezifische DNA-Viren und gehören der Familie der Papillomaviridae an (de Villiers *et al.*, 2004). Derzeit ist das vollständige Genom von etwa 100 humanen kutanen sowie anogenitalen HPV-Typen bekannt, doch ist die Gesamtzahl wahrscheinlich deutlich höher (de Villiers *et al.*, 2004).

Die ikosaedrischen HPV-Partikel bestehen aus 72 Kapsomeren und haben einen Durchmesser von ca. 55 nm. Sie enthalten ein doppelsträngiges, zirkulär geschlossenes DNA-Genom, welches 7-8 Kilobasenpaare (kb) umfasst und mit zellulären Histonproteinen in einer Nukleosomen ähnlichen Struktur vorliegt (Pfister and Fuchs, 1987; 1994). Das Genom weist kodierende und nicht-kodierende Bereiche auf („non-coding-region“, NCR) (s. Abbildung 6). Die NCR-Region beinhaltet die wichtigsten *cis*-Kontrollelemente für die Regulation der Transkription und Replikation des viralen Genoms. Der kodierende Bereich umfasst Leserahmen, deren Produkte im viralen Vermehrungszyklus zu teilweise unterschiedlichen Zeitpunkten exprimiert werden. Sie kodieren für Proteine, die dementsprechend als frühe („early“, E) und späte („late“, L) Proteine bezeichnet werden. Die teilweise überlappenden offenen Leserahmen („open reading frames“, ORFs), die für virale Proteine kodieren, liegen alle auf einem DNA-Strang und nehmen trotz großer Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen Typen homologe Positionen ein (Pfister and Fuchs, 1987). Die Produkte der früheren Gene erfüllen vor allem regulatorische Funktionen bei der Replikation, Transkriptionskontrolle und Zellproliferation, während Produkte der späten Gene die Strukturproteine des Kapsids bilden (s. Abbildung 6).

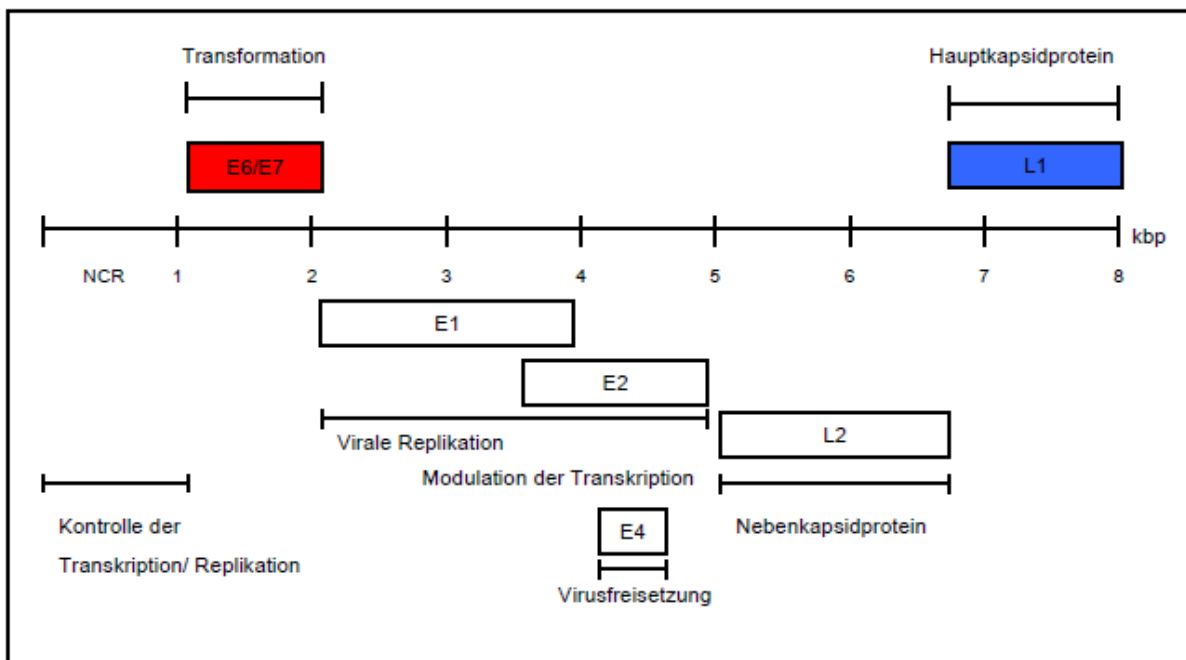


Abbildung 6: Schematische Darstellung des HPV8 Genoms. Die früh exprimierten Gene E1 und E2 codieren für Proteine, welche an der viralen Replikation und Transkription beteiligt sind. Das E4-Protein ist für die Virusfreisetzung verantwortlich, das E6- und E7-Protein spielt eine Rolle bei der Transformation. Die spät translatierten Gene L1 und L2 codieren für die Kapsidproteine. Blau, L1-Gen (HPV-Typisierung); Rot, E6/E7-Transkript (Expressionsanalyse).

Der phylogenetische Stammbaum der Papillomviren gliedert sich in die alpha-, beta- und gamma-Subgruppe (de Villiers *et al.*, 2004; Gottschling *et al.*, 2007). Zur alpha-Papillomviren-Subgruppe gehören die Auslöser kutaner Hautwarzen, die als Warzen-assoziierte Typen bezeichnet werden (Gottschling *et al.*, 2007). Diese größte bekannte Subgruppe infiziert überwiegend die Schleimhäute des Anogenitaltraktes. Diese auch als mukosotrop oder genital bezeichneten HPV-Typen werden in Niedrig- sowie Hochrisikoviren unterschieden (Muñoz *et al.*, 2003). Die mit dem Zervixkarzinom und einem Teil der Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome assoziierten HPV-Typen 16 und 18 sind die Hauptvertreter der sogenannten *high-risk* genitalen HPV-Typen (Gissmann, 1992). HPV-Typen wie 6 und 11 (Gissmann *et al.*, 1993), die genitale Warzen verursachen und nur selten in malignen Tumoren des Anogenitaltraktes auftreten, werden als *low-risk* genitale HPV-Typen bezeichnet (Munoz *et al.*, 2003).

Die Proteine E6 und E7 der *high-risk* mukosotropen HPV-Typen besitzen zelltransformierende Eigenschaften und induzieren die Zellproliferation (zur Hausen, 2000). Das E6-Protein interagiert mit dem Tumorsuppressorprotein p53 nach Bindung des

Ubiquitinligase E6-AP („E6 associated protein“) (Werness *et al.*, 1990) und führt es dem Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau zu (Scheffner *et al.*, 1993). Das E7-Protein interagiert mit dem Retinoblastomprotein pRB (Dyson *et al.*, 1989) und führt zu dessen Abbau über das 26S-Proteasom (Berezutskaya and Bagchi, 1997).

1.7 ROLLE VON HPV BEI DER ENTSTEHUNG VON NICHT-MELANOZYTÄREM HAUTKREBS (NMSC)

Die zweitgrößte Subgruppe der Papillomviren (beta) umfasst HPV-Typen, die in Läsionen von *Epidermodysplasia verruciformis* (EV)-Patienten entdeckt wurden (Jablonska *et al.*, 1972). EV ist eine äußerst seltene, genetisch bedingte Hauterkrankung (Jablonska and Majewski, 1994) und zeichnet sich durch eine ausgeprägte Prädisposition für HPV-Infektionen aus, die zu lebenslang persistierenden, gutartigen Hautläsionen wie flachen Warzen und makulären Läsionen führt. In einem Zeitraum von 10 bis 20 Jahren entwickeln sich auf dem Boden der primären benignen Tumoren multiple, präkanzeröse Läsionen, die bei bis zu 60% der EV-Patienten zu SCCs entarten (Fuchs and Pfister, 1994). Auffällig ist, dass in ca. 90% der EV-Karzinome HPV5 oder HPV8 nachweisbar sind (Orth *et al.*, 1978), obwohl sich in den benignen EV-Läsionen etwa 20 verschiedene EV-assoziierte Virustypen nachweisen lassen (Pfister, 1992). Mehrere Studien zeigen, dass diese HPV-Typen nicht nur in Plattenepithelkarzinomen von EV-Patienten vorkommen, sondern auch in malignen, nicht-melanozytären Hauttumoren von nierentransplantierten und immunsupprimierten Patienten sowie in normaler Haut (Berkhout *et al.*, 2000; Boxman *et al.*, 1999; Harwood *et al.*, 2000; Pfister and Schegget, 1997).

Die transformierenden Eigenschaften von E6- und E7-Proteinen von kutanen HPV-Typen sind gegenüber den genitalen *high-risk*-Typen kaum untersucht. Die Transkripte der E6 und E7-Sequenz von kutanen HPV5 konnten in benignen Hautläsionen von EV-Patienten nachgewiesen werden (Haller *et al.*, 1995). Das E7-Protein von HPV38 zeigte transformierende Aktivität durch Interaktion mit *pRB* (Caldeira *et al.*, 2003). Das E7-Protein des HPV8 zeigte sich als relevant für die Invasion humaner Keratinozyten in die Dermis in einer *in vitro* Zellkultur (Akgül *et al.*, 2005).

Die UV-Strahlung begünstigt HPV-Infektionen der Haut und trägt so möglicherweise zur Entartung primär benigner Läsionen bei. Diese Hypothese konnte durch die Entdeckung eines

UV-responsiven Kontrollelements im Promotor des Warzen-assoziierten HPV77 unterstützt werden, durch das die p53-abhängige Virusreplikation reguliert wird (Purdie *et al.*, 1999). Eine weitere Interaktion zwischen kutanen HPV5 (beta Subgruppe) oder Warzen-assoziierten HPV10 und 77 (alpha-Subgruppe) und Sonnenexposition zeigten Jackson und Storey (2000). Dabei wurde durch das E6-Protein von HPV5, 10 und 77 nach UV-Bestrahlung die Apoptose der Keratinozyten unabhängig von p53 inhibiert, indem das E6-Protein die Degradation des UVB-induzierten BAK-Proteins einleitet (Jackson *et al.*, 2000). *In vitro* Studien deuten auf weitere Funktionen des E6-Proteins für einige HPV-Typen hin. So konnte gezeigt werden, dass das E6-Protein mit dem DNA-Reparaturprotein XRCC1 interagiert (Iftner *et al.*, 2002), dadurch wird die DNA-Reparatur nach UV-induzierten Mutationen beeinträchtigt (Giampieri and Storey, 2004). Während die kausale Rolle von HPV bei der Entstehung genitaler Tumore sehr gut beschrieben ist, bleibt bis heute unklar, in welcher Weise sie an der kutanen Onkogenese beteiligt sind.

1.8 ZIELSETZUNG

Die Pathogenese nicht-melanozytärer Hauttumore (NMSC) ist auf molekularer Ebene bisher nicht vollständig aufgeklärt. Für ihre Entstehung werden unterschiedliche Faktoren als Risikofaktoren angenommen. Dazu zählen unter anderem Immunsuppression, übermäßige UV-Exposition und die Infektion mit Humanen Papillomviren (HPV). In der vorliegenden Studie werden das Genexpressionsmuster und die Infektion mit HPV molekularbiologisch bei NMSC von immunsupprimierten, organtransplantierten Patienten detailliert untersucht.

[1] Die Kenntnis möglichst aller Gene mit Beteiligung an der Initiation, Promotion, Manifestation und Invasion von nicht-melanozytärem Hautkrebs kann dazu beitragen, die zugrunde liegenden Mechanismen des kutanen Plattenepithelkarzinoms (SCC) zu verstehen. Durch den Vergleich der Genexpressionsprofile von SCC mit normaler Haut sollen neue bzw. karzinogene Gene identifiziert werden, die den Tumor charakterisieren. Mittels quantitativer *real-time* RT-PCR (qPCR) soll die Expression der differenziell regulierten Gene in SCC verifiziert werden. Dabei wird ein besonderes Augenmerk auf folgende Fragen gelegt:

- Lässt sich ein spezifisches Genexpressionsmuster für die zu untersuchenden SCC und dessen Vorstufe Aktinische Keratosen (AK) identifizieren?
- Korrelieren diese Gene mit dem Tumorprogressionsstadium AK und dem invasiven Plattenepithelkarzinom?

[2] Ein zweiter Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung des möglichen kausalen Zusammenhangs einer HPV-Infektion mit der Entwicklung von SCC. Im Zuge dessen wird die Anwesenheit der HPV-Typen in verschiedenen Stadien der Erkrankung bzw. zu einem bestimmten Zeitpunkt der Erkrankung in SCC ermittelt. Zusätzlich wird die Aktivität der HPV-Infektion in SCC-Erkrankungen untersucht. Detailliert sollen folgende Fragen geklärt werden:

- Sind spezifische HPV-Typen selektiv in SCC mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert?
- Ist die Aktivität der identifizierten HPV-Typen in den untersuchten Geweben von AK, SCC bzw. Normalhaut nachweisbar?

2 MATERIAL

2.1 PATIENTENPROBEN

Im Rahmen der Diagnostik und Therapie von AK und SCC wurden Hautproben von immunsupprimierten, organtransplantierten Patienten sowie nicht-organtransplantierten, immunkompetenten Patienten in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Mitte entnommen (Tabelle 1 und 2). Fünfzehn Proben von fünf Patienten mit multiplen Hauttumoren (Tabelle 1) wurden für die cDNA-Microarray-Analysen entnommen und untersucht. Zusätzlich wurden weitere fünf normale Hautproben von immunkompetenten Patienten für die cDNA-Microarray-Analysen verwendet (Tabelle 1). Diese wurden anschließend für die Verifizierung mittels quantitativer *real-time* RT-PCR (qPCR) eingesetzt.

Tabelle 1: Hautproben von 5 SCC-Patienten und 5 immunkompetenten Kontrollen für die cDNA-Microarray-Analysen

Pat.-Nr.	G./Alter	TX	Zeit nach TX	normale Haut	AK	SCC
1	w/60 J.	Niere	23 J.	Unterarm ^a	Finger	Hand
2	m/66 J.	Niere	11 J.	Unterarm ^a	Unterschenkel	Stirn
3	m/58 J.	Leber	12 J.	Unterarm ^a	Unterschenkel ^b	Unterschenkel
4	m/73 J.	Herz	9 J.	Unterarm ^a	Vertex	Stirn
5	m/69 J.	Niere	2 J.	Unterarm ^a	Ohr ^b	Stirn
6	m/57 J.	N-TX		Kopf	nd	nd
7	w/61 J.	N-TX		Wange	nd	nd
8	w/61 J.	N-TX		Kopf	nd	nd
9	w/71 J.	N-TX		Gesicht	nd	nd
10	m/17 J.	N-TX		Gesäß	nd	nd

AK, Aktinische Keratose; G., Geschlecht; J., Jahr; m, männlich; NMSC, *non-melanoma skin cancer*; Nr, Nummer; nd, nicht durchgeführt; N-TX, nicht transplantiert; Pat, Patient; SCC, *squamous cell carcinoma*; TX, Transplantation; w, weiblich

^a RNA aus normaler Haut wurde zusammengeführt

^b RNA aus AK wurde zusammengeführt

Für die HPV-Expressions-Analysen mittels qPCR wurden aus sechs Patienten mit multiplen Hauttumoren insgesamt 31 Proben entnommen und untersucht (Tabelle 2). Zur HPV-Typisierung der kutanen beta- und gamma-Subgruppe wurde die DNA aus diesen Proben isoliert, mittels *Beta-Gamma-Cutaneous-PCR* (BGC-PCR) amplifiziert und mit anschließendem *Reverse Line Blot* (RLB) typisiert.

Für die Expressionsanalysen von Tn-C mittels qPCR und die folgenden immunhistologischen Untersuchungen wurden 25 normale Hautproben, 19 AK und 22 SCC von 66 Patienten entnommen und untersucht (Tabelle 10, s. Anhang).

Alle Hautläsionen wurden exzidiert und halbiert; eine Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff direkt nach Entnahme schockgefroren. Anschließend wurden die Proben bei -70°C gelagert und dienten zur Isolierung von DNA, RNA und Proteinen. Die andere Hälfte wurde histologisch durch Herrn Dr. J. Röwert untersucht (Histopathologisches Labor, Klinik für Dermatologie, Charité, CCM).

Tabelle 2: Hautproben der 6 NMSC-Patienten für die HPV-Analysen

Pat.-Nr.	Geschlecht	Nr.	Alter	TX	Histologie	Lokalisation
1	m	1	61 J.	Niere	normal	Wange
		2			AK, bowenoid	Wange
		3			normal	Unterarm
		4			SCC	Unterarm
2	m	5	54 J.	Niere	AK	Wange
		6			normal	Wange
		7			SCC	Wange
		8			Vv	Hand
		9			Vv	Stirn
		10			Vv	Ohr
3	w	11	62 J.	Niere	AK	Wange
		12			Vv	Zeh
		13			Vv	Finger
		14			Vv	Finger
		15			BCC	Nase
		16			SCC	Knie
4	w	17	54 J.	Niere	Vv	Hand
		18			normal	Arm
		19			Vv	Finger
		20			Vv	Stamm
		21			normal	Finger
5	m	22	56 J.	Herz	SCC	Finger
		23			normal	Arm
		24			Vv	Finger
6	w	25	60 J.	Niere	SCC	Hand
		26			normal	Rücken
		27			Vv	Brust
		28			Vv	Bein
		29			SCC	Unterschenkel
		30			SCC	Hand
		31			AK	Finger

AK, Aktinische Keratose; BCC, *basal cell carcinoma*; J.; Jahr; m, männlich; NMSC, *non-melanoma skin cancer*; Nr., Nummer; Pat., Patient; SCC, *squamous cell carcinoma*; TX, Transplantation; w, weiblich; Vv, Warze

2.2 REAGENZIEN UND ZELLINIEN

2.2.1 Reagenzien

Alle handelsüblichen Substanzen wurden von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), SIGMA-ALDRICH (Steinheim), SERVA (Heidelberg), Biorad (München) und Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg) bezogen. Spezielle Reagenzien sind nachfolgend aufgeführt:

Natriumacetat (NaOAc), pH 4.6	Ambion, Austin, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
50x TAE	Invitrogen, Karlsruhe
20x TE	Molecular Probes, Leiden, Niederland
β -Mercaptoethanol	SIGMA, München
Glycogen (20 ng/ml)	Roche, Mannheim
DEPC	SIGMA, München
RNase Free H ₂ O	Qiagen, Hilden
RNase Zap	SIGMA, München
DNase, RNase Free H ₂ O	Invitrogen, Karlsruhe
SeaKem® LE Agarose	Biowhittaker, Rockland, ME, USA
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
AEC-Gebrauchslösung	DAKO, Hamburg
50x Na-Citrat-Puffer; pH 6,0	ProTaqstura, Quartett GmbH, Berlin
50x TBS; pH 7,6	ProTaqstura, Quartett GmbH, Berlin
10x PBS; pH 7,0	BioWhittaker, Cambrex, Belgien

2.2.2 Antikörper

Tenascin-C (143DB7; IgG2a), Maus monoklonal Biohit, Rosbach

2.2.3 Enzyme

Alle für diese Arbeiten relevanten Enzyme wurden bei folgenden Firmen erworben: Roche (Mannheim), GibcoBRL (Eggenstein), New England Biolabs (Schwalbach), Qiagen (Hilden), Promega (Madison, USA) und Stratagene (Heidelberg).

DNase I (1 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K (20 mg/ml)	Roth, Karlsruhe

2.2.4 Größenmarker

DNA-Marker 100 bp-Leiter,	Roth, Karlsruhe
pUC19/Msp I, 250 bp-Leiter	Roth, Karlsruhe
NEB 1 kb DNA-Ladder	New England Biolabs, Frankfurt/M

2.2.5 Zelllinien

Die SiHa-Zelllinie ist positiv für HPV 16 (1-2 HPV Kopien/Zelle) und wurde von Dr. T. Meyer, Institut für Pathologie und Molekularbiologie Hamburg, bezogen.

Die HeLa-Zelllinie ist die erste menschliche (www.ATCC.com), von der eine permanente Zellkultur etabliert wurde und hat 20 bis 50 HPV18-Genome pro Zelle integriert. HeLa-Zellen wurden bezogen von Dr. T. Meyer, Institut für Pathologie und Molekularbiologie, Hamburg.

2.3 MEDIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER

2.3.1 Medien für die Zellkultur

DMEM-Glutamax	GibcoBRL, Eggenstein
DMEM	Biochrom, Berlin
DMEM/F12 (1:1)-Glutamax	GibcoBRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA-Lösung	GibcoBRL, Eggenstein
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	GibcoBRL, Eggenstein
bereits inaktiviertes fötales Kälberserum	GibcoBRL, Eggenstein
Penicillin-Streptomycin-Lösung	GibcoBRL, Eggenstein

2.3.2 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit autoklaviertem, demineralisiertem Wasser (*Aqua bidest.*, Millipore) hergestellt.

20 x SSPE, pH 7,4:	3,6 M NaCl; 200 mM NaH_2PO_4 ; 20 mM EDTA
20x SSC, pH 7,0:	3,0 M NaCl; 0,3 M NaCitrat
Prähybridisierungspuffer (RLB):	2 x SSPE; 0,1% SDS (BDH)
Posthybridisierungspuffer (RLB):	2 x SSPE; 0,5% SDS (BDH)
DNA-Gelladepuffer:	1x TE pH 8,0; 40% Glycerin; 0,25% Bromphenolblau 0,5 M NaHCO_3 , pH 8,4 20 mM EDTA, pH 8,0 0,5 M Phosphat-Puffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6,8 50 mM Tris/5 mM EDTA (5xTE), pH 8,0

2.4 REAGENZSYSTEME (KITS)

LightCycler FastStart DNA Master	
SYBR Green I	Roche, Mannheim
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RiboGreen RNA Quantitation Kit	Molecular Probes, Leiden, Niederland
OliGreen ssDNA Quantitation Kit	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
SuperScript™ First-Strand Synthesis System	Invitrogen, Karlsruhe
ABI PRISM® Big Dye™ Terminator	
Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v. 2.0	Applied Biosystems, Darmstadt
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche, Mannheim

2.5 VERWENDETE GERÄTE

Neben Laborgeräten wie Tischzentrifuge, Thermomixer, Vortexer, Heiz- und Magnetrührer und pH-Meter wurden nachfolgende Geräte verwendet:

ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Forster City, USA
LightCycler® Instrument 1.0 und 1.5	Roche Diagnostics, Mannheim
Spektrofluorometer Lambda FLUORO 320	BIO-TEK Instruments, Winooski, USA
Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikrotom HN40	Reichert-Jung, Leica, Deerfield
Mikroskop-Kamera PowerG3	Canon, Krefeld
Miniblotter MN45	Immunetics, Boston, MA, USA

Geldokumentationssystem		Syngene, Cambridge, UK
Mini Protean II System		Biorad, München
Power Pac 300		Biorad, München
Hybridisierungssofen:	HERAhybrid 6	Kendro Lab, Hanau
	GFL 7601	GFL, Burgwedel
PCR-Thermocycler:	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
	PE9600	Perkin Elmer, Jügesheim

2.6 SYNTHETISCH HERGESTELLTE NUKLEINSÄUREN

Für das Design spezifischer Oligonukleotide wurde die Internet-Suchmaschine *primer3* genutzt (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_web.cgi). Alle verwendeten HPLC-gereinigten Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Zur Verifizierung der cDNA-Microarray-Analyse wurden 13 Kandidatengene ausgewählt und mittels quantitativer *real-time* RT-PCR (qPCR) untersucht. Die Oligonukleotide der Kandidatengene wurden auf ihre Anlagerungstemperatur ($T_{\text{ann}} = \text{annealing}$) und MgCl_2 Konzentration optimiert (Tabelle 3). Alle verwendeten Nukleinsäuren sind in den Tabellen 3, 4 und 5 aufgelistet.

Tabelle 3: Synthetisch hergestellte Oligonukleotide der Kandidatengene für die qPCR.

Name	Nukleotidequenz 5'→3'	Referenz Acc.nr.	Produkt- größe	MgCl ₂	T _{ann}
ERCC1-F ERCC1-R	GGG AAT TTG GCG ACG TAA TTC GCG GAG GCT GAG GAA CAG	NM_001983.1	90 bp	4 mM	60°C
IL4R-F IL4R-R	CAC CTG CCT CTG TCT CAC TGA A GGC CGC CCA AGT CAT TC	NM_000418.1	75 bp	3 mM	55°C
Tn-C-F Tn-C-R	ACT GTG GAC GGA ACC AAG AC TGT GGT GAA TGA CCC TGA GA	NM_002160.1	126 bp	4 mM	60°C
GRN-F GRN-R	CAG TGG GAA GTA TGG CTG CT TTA GTG AGG AGG TCC GTG GT	NM_002087.1	144 bp	3 mM	60°C
NMI-F NMI-R	GAC ACA CTG CGT GAA GAT CAA TCC AAT CTC CAC AAA CGT GA	NM_004688.1	138 bp	5 mM	60°C
IL-1RN-F IL-1RN-R	GGA AGA TGT GCC TGT CCT GT CGC TTG TCC TGC TTT CTG TT	NM_173841.1 U65590	103 bp	4 mM	60°C
MAP4K4-F MAP4K4-R	CTG GTC ACT TGG ATG GTG TG AGA CCG AAC AGA GGC AAA GA	NM_145687.1	98 bp	4 mM	60°C
CGI-39-F CGI-39-R	CGT CAA AGG TGA AGC AGG AC ATT ATG CTC CAG TGC CCG TA	NM_015965.3	145 bp	3 mM	55°C
NKEFB-F NKEFB-R	ACC CAG GAA AGG GCA GAC TTC TAG GTG GAG GCA TTG AGA	L19185.1	93 bp	4 mM	55°C
RAB31-F RAB31-R	TGA CCA CAA CAT CAG CCC TA AAT GAA ACC GTT CCT GAC CA	NM_006868.1	116 bp	3 mM	55°C
APR-3-F APR-3-R	GGT TCT GAT TTC GTC CCT GA CAG CAT TAG CTC TCG TGT CG	NM_016085.2	124 bp	4 mM	55°C
MMP1-F MMP1-R	CTT GCA CTG AGA AAG AAG ACA AAG G ACA CCC CAG AAC AGC AGC	NM_002421.2	74 bp	3 mM	60°C
CDH1-F CDH1-R	TGA AGG TGA CAG AGC CTC TGG AT TGG GTG AAT TCG GGC TTG TT	NM_004360.2	150 bp	3 mM	60°C
RPS9-F RPS9-R	ATC CGC CAG CGC CAT A TCA ATG TGC TTC TGG GAA TCC	U14971	86 bp	3 mM	60°C

Acc.nr., accession number (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide>); bp, Basenpaar

Zusätzlich zu den Kandidatengenomen ist in Tabelle 3 das Referenzgen RPS9 aufgeführt, welches zur Normalisierung der ermittelten Werte diente.

Zur Bestimmung der HPV-Aktivität in den NMSC-Proben wurden die in Tabelle 4 zusammengefassten Oligonukleotide verwendet, die ebenfalls auf ihre Anlagerungstemperatur (T_{ann}) und MgCl_2 -Konzentration optimiert wurden (s. Tab. 4). Die Längenangaben (nt) beziehen sich bei HPV-Nukleotiden auf das Nummerierungssystem von HPV8, 9, 15 und 20 (Fuchs *et al.*, 1986).

Tabelle 4: Synthetisch hergestellte Oligonukleotide zur HPV Expressionsanalyse mittels qPCR.

Name	Nukleotidequenz 5'→3'	Referenz Acc. Nr.	Position (nt.)	Produkt- größe	MgCl_2	T_{ann}
HPV5 E6-F HPV5 E6-R	GCC GAA CAC CAA CAG AAA CT AAC AAT CAA TCA CAG GGA TGC	M17463	212-311	100 bp	3 mM	60°C
HPV5 E7-F HPV5 E7-R	GGT TGC AGG AAC TGT GAG GT GCA GAT CTC CGG TCA GTA GC	M17463	831-924	94 bp	4 mM	60°C
HPV8 E6-F HPV8 E6-R	TAC GTT GTT ACT GCG TGT TGT C GCC TAG CAC AGT TTG CTC ATA A	M12737.1	391-477	87 bp	3 mM	60°C
HPV8 E7-F HPV8 E7-R	TGC TGT CAG GTC AAG CTA CG GGC ACT CAG GAC ACA GAA GC	M12737.1	830-935	106 bp	3 mM	60°C
HPV9 E6-F HPV9 E6-R	AGC TTA TTT GGA CAG AGG AGG A GTG CAG ACG CAT AAG CAC AG	X74464.1	363 -428	66 bp	3 mM	55°C
HPV9 E7-F HPV9 E7-R	CAA GAT CGT AGC TGG CTG TG CTG TTG CGC TCG AAT TCC TA	X74464.1	777 -858	82 bp	3 mM	60°C
HPV15 E6 -F HPV15 E6-R	TGC AGT TAA TTT GGA CTG AGG A ATT CAA ACT GCG CTG TAG CA	X74468.1	339- 416	78 bp	3 mM	60°C
HPV15 E7 -F HPV15 E7-R	CAA GAT TGT AGT TCC GTG TTG C CTT GTT GTG AGC GAA TTC CA	X74468.1	753- 838	86 bp	3 mM	60°C
HPV20 E6-F HPV20 E6-R	GGC AAC AGC GAC ATA TGA GTT CAG ATT TGC CTG TTA CTT GCT C	U31778	469- 551	83 bp	3 mM	60°C
HPV20 E7-F HPV20 E7-R	GAG GAG TTA CCG AAC GAG CA TGA GGC TCT TTC AAT CTG AGG	U31778	787- 846	60 bp	3 mM	60°C

Acc.nr, accession number (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide>); bp, Basenpaar

Zur Analyse der Tn-C Spleißvarianten wurden die in Tabelle 5 zusammengefassten Oligonukleotide verwendet.

Tabelle 5: Synthetisch hergestellte Oligonukleotide zur Tn-C Spleißanalyse mittels PCR.

Name	Nukleotidequenz 5'→3'	Referenz	Verwendung
TEN5	ACC GCT ACC GCC TCA ATT AC	1*	Spleißanalyse /Sequenzierung
TEN6	GGT TCC GTC CAC AGT TAC CA	1*	Spleißanalyse /Sequenzierung
T11F	CAA TTT GGG AGA GGT CGT GG	2*	Spleißanalyse /Sequenzierung
T14F	TCT GGT GCT GAA ACG AAC TGC	2*	Spleißanalyse /Sequenzierung
T16P	GTT GTC AAC TTC CGG TTC GG	2*	Spleißanalyse /Sequenzierung
T17F	AAG TGG AGA GCT TCC GGA TT	Studie	Southern Blot/Sonde
TEN6	GGT TCC GTC CAC AGT TAC CA	1*	Southern Blot/Sonde

Accession number: NM_002160.1; 1*, Latijnhouwers et al., 2000; 2* ; Adams et al., 2002

3 METHODEN

3.1 ZELLKULTUR

Für diese Arbeit wurden die Keratinozytenzelllinien SiHa und HeLa verwendet. Sie wurden, soweit nicht anders bezeichnet, in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Natrium-Pyruvat, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren, 2 mM L-Gluamin und 10% hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum (FCS) in einem Inkubator bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt. Dazu wurden die adhärennten Zellen nach 2-maligem Waschen mit PBS mit 2,5 ml Trypsin-EDTA inkubiert und nach Ablösung der Zellen von der Flasche je nach Proliferation 1:4 bis 1:10 verdünnt und in frischem Medium ausplattiert.

3.2 ISOLATION VON NUKLEINSÄUREN

3.2.1 RNA-Isolation aus Zelllinien

Die Isolation der gesamten RNA erfolgte aus 1 Mio. Zellen mittels RNeasy® Mini Kit von Qiagen gemäß Protokoll. Die gewonnene RNA wurde mit DEPC-Wasser in einem Volumen von 50 µl aufgenommen und bei -80°C gelagert.

3.2.2 RNA-Isolation aus Biopsien

Unter Verwendung des RNeasy® Micro Kit erfolgte die Isolierung der gesamten RNA aus schockgefrorenen Biopsien nach Herstellerangaben mit nachfolgend genannten Modifikationen des Protokolls. Die Biopsien wurden mit sterilem Präparierbesteck in kleine Stücke geschnitten und anschließend in 300 µl RLT-Puffer/ 1% β-Mercaptoethanol aufgenommen. Unter Zusatz von 20 ng Glykogen wurden die Proben mit einem „Rotor-Stator“ Homogenisator (Ultra Turax T25) homogenisiert. Anschließend erfolgte ein Proteinverdau mit 5 U Proteinase K bei 55°C für 15 min. Nach der Zentrifugation bei 14 000 rpm für 10 min

wurde das Lysat für die weiteren Schritte der Isolierung entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die gewonnene RNA wurde mit 30 µl DEPC-Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

3.2.3 DNA-Isolation aus Biopsien

Die Isolation der DNA aus Hautbiopsien erfolgte unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kit gemäß Protokoll. Die extrahierte DNA wurde in einem Volumen von 100 µl aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.3 QUANTIFIZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

3.3.1 RNA-Quantifizierung

Die Bestimmung der RNA erfolgte mit dem RiboGreen® RNA Quantifizierungs-Kit in einer 96 Well-Microtiter-Platte. Die folgenden Messungen der Proben wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. Es wurden 100 µl 1:50 in TE-Puffer verdünnte RNA in die Wells pipettiert. Nach Zugabe von 100 µl 1:2000 in TE-Puffer verdünnter RiboGreen-Lösung wurden die Proben 2 bis 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Fluoreszenz bei 525 nm mit einer Anregungswellenlänge von 500 nm in einem Spektrofluorometer „Lambda FLUORO 320“ gemessen. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels einer RNA-Eichgeraden, die im benötigten RNA-Konzentrationsbereich von 1000 – 50 ng/ml einen linearen Verlauf aufwies.

3.3.2 cDNA-Quantifizierung

Die cDNA-Quantifizierung erfolgte analog zur RNA-Quantifizierung mit dem OliGreen® „single strand DNA“ Quantifizierungs-Kit in einer 96 Well-Microtiter-Platte. Das Volumen und die Verdünnungen der cDNA erfolgten analog zur RNA-Quantifizierung. Nach Zugabe 100 µl 1:200 in TE-Puffer verdünnter OliGreen-Lösung wurden die Proben entsprechend den Bedingungen der RNA-Quantifizierung angewendet. Die Konzentration der cDNA-Proben wurde über eine cDNA-Eichgerade mit einem Konzentrationsbereich von 50 – 0,5 ng/ml errechnet.

3.4 SYNTHESE VON cDNA

Vor jeder cDNA-Synthese erfolgte eine DNase-Behandlung der RNA mittels DNaseI gemäß den Angaben des Herstellers, um Kontaminationen mit genomischer DNA zu verhindern.

Durch reverse Transkription (RT) wurde aus einer RNA-Matrize einzelsträngige cDNA synthetisiert. Um spezifisch mRNA umzuschreiben, wurden 12-18 Basen lange Oligo(dT)-Oligonukleotide gewählt, die nur an der polyadenylierten 3'-Region der mRNA hybridisierten und als Erkennungsstelle für die Reverse Transkriptase dienten. Für die Synthese des ersten cDNA-Strangs wurde das „SuperScript First-Strand Synthesis-System“ genutzt. Im Detail wurden 1 µg gesamter RNA mit 250 nM Oligo(dT)-Oligonukleotid und 500 µM dNTPs gemischt für 5 min bei 65°C denaturiert und danach auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 2 µl 10x First Strand Buffer[®], 2 µl DTT (100 mM), 5 mM MgCl₂, 0,5 U RNaseOut[™], 1 U SuperScript[™] II RT bei 42°C für 60 min und bei 70°C für 10 min inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde wie unter 3.3.2 beschrieben quantifiziert und bei -20°C aliquotiert gelagert. Für die unterschiedlichen Fragestellungen wurde die cDNA der Proben zur weiteren Analyse in die LightCycler[®] PCR eingesetzt.

3.5 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Zur Amplifikation definierter DNA-Fragmente wurde die Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) (Mullis and Faloona, 1987) angewandt. Spezifische Oligonukleotide (Primerpaare), die an flankierenden Regionen der zu amplifizierenden Sequenz binden, fungierten dabei als Startpunkte der DNA-Replikation. Die Zielsequenz wurde dadurch um den Faktor 2ⁿ vermehrt, wobei n gleich der Anzahl der Zyklen ist. Um eine erneute Polymerasezugabe nach jedem Denaturierungsschritt zu vermeiden, wurden thermostabile Polymerasen wie z. B. *Taq*-DNA Polymerase eingesetzt, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurden (Chien *et al.*, 1976).

Mittels konventioneller PCR wurden die neusynthetisierten Oligonukleotide für die *real-time* PCR-Analysen (siehe Abschnitt 3.11) auf ihre Spezifität kontrolliert. Die spezifische Anlagerungstemperatur (*annealing*-Temperatur) wurde für jedes Oligonukleotid bestimmt (s. Temperaturoptimierung). Die konventionelle PCR wurde mit den nachfolgenden Komponenten durchgeführt.

Pipettierschema 1: Konventionelle PCR

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
<i>DNA</i>	20-50 ng	1–5 µl *
<i>F-Oligonukleotid (100 µM)</i>	0,5 µM	0,5 µl
<i>R-Oligonukleotid (100 µM)</i>	0,5 µM	0,5 µl
<i>dNTP (2 mM)</i>	0,2 mM	5,0 µl
<i>10x Puffer (inkl. 15 mM MgCl₂)</i>	1x	5,0 µl
<i>MgCl₂</i>	1,5 mM	
<i>Taq Qiagen (5 U/µl)</i>	1,5 U	0,3 µl
<i>Aqua bidest</i>		38,2–34,2 µl *
Gesamtvolumen pro Probe		50 µl

*Abhängig von der DNA-Konzentration und Qualität

Die Anlagerungstemperatur (*annealing*) wurde für jedes Oligonukleotid-Paar mittels einer Gradienten-PCR getestet. Hierbei wurde mit identischen Reaktionsansätzen eine PCR mit unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen (55°C, 58°C, 60°C, 63°C und 65°C) durchgeführt.

Temperaturprotokoll 1: Temperaturoptimierung im Eppendorf Mastercycler Gradient

Schritt	T [°C]	t [sec]	n [Zyklen]
<i>Initiale Denaturierung</i>	96	240	1
<i>Denaturierung</i>	96	45	} x 40
<i>Annealing</i>	55–65 ^a	45	
<i>Elongation</i>	72	30	
<i>Finale Elongation</i>	72	240	1
<i>Abkühlung</i>	4	∞	1

^a unterschiedliche Anlagerungstemperatur

Nach anschließender PCR wurden die Proben bis zur Agarosegelelektrophorese bei 4°C gelagert.

3.6 AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Durch Gelelektrophorese wurden Nukleinsäurefragmente im elektrischen Feld ihrer Größe und Ladung entsprechend aufgetrennt. Die Agarose bildet eine Netzstruktur, durch die die Nukleinsäuren in dem angelegten elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode wandern. Dabei lag eine lineare Abhängigkeit zwischen der elektrophoretischen Mobilität der Moleküle und der Gelkonzentration vor. Das Auflösungsvermögen hängt wesentlich von der Dichte der Netzstruktur, also von der Agarosekonzentration ab.

Als Elektrophorese-Puffer wurde 0,5 x TAE verwendet. Die Spannung betrug ca. 70 V bei 130 mA. Zur Visualisierung der PCR-DNA-Fragmente enthielten die Gele 0,5%ige Ethidiumbromidlösung. Das sich in doppelsträngiger DNA einlagernde Ethidiumbromid ist im Transilluminator nach Anregung bei einer Wellenlänge von 254 nm für das menschliche Auge sichtbar. Mit dem Dokumentationssystem Syngene wurden die Gele digital fotografiert.

3.7 DNA-SEQUENZIERUNG

In der hier verwendeten Methode, die eine Variante von Sanger *et al.* (1977) darstellt, wurde doppelsträngige DNA in die Sequenzreaktion eingesetzt. Entsprechende Oligonukleotide in einer Konzentration von 3 bis 10 pmol und ca. 100 ng Plasmid-DNA oder 10 ng PCR-Fragment wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 20 µl auf einem „310 ABI Prism Sequencer“ sequenziert und entsprechend nach dem ABI Prism® Protokoll (BigDye™ Cycle Sequencing Ready Reaction Kits Protocol) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Edit View.

Pipettierschema 2: Sequenzierungs-PCR

Komponenten	Volumen pro Probe
<i>F-oder R-Oligonukleotid (3 µM)</i>	1 µl
<i>dRhodamin/BigDye</i>	6 µl
<i>DNA</i>	1–12 µl *
<i>Aqua bidest</i>	11–0 µl *
Gesamtvolumen pro Probe	20 µl
* abhängig von der DNA-Konzentration und Fragmentlänge	

Temperaturprotokoll 2: Biometra T3 Thermocycler

Schritt	T [°C]	t [sec]	n[Zyklen]
<i>Initiale Denaturierung</i>	96	30	1
<i>Denaturierung</i>	96	30	} x 25
<i>Annealing</i>	50	15	
<i>Elongation</i>	60	240	
<i>Abkühlung</i>	10	∞	1

3.8 SOUTHERN BLOT**3.8.1 Herstellung DIG-markierter Sonden für die Southern-Hybridisierung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden spezifische Digoxigenin-11-Deoxyuridinetriphosphat (DIG)-markierte Hybridisierungssonden für Tn-C generiert, die weiter in der Southern Blot-Analyse zur Bindung spezifischer Tn-C-Transkripte verwendet wurden. Die Sonde für Tn-C wurde mit T17F/TEN6-Oligonukleotiden und cDNA aus SiHa-Zellen in einer konventionellen PCR generiert. Anschliessend erfolgte mit dem „DIG-High Prime“-System die Markierung mit DIG. Dazu wurden 16 µl der aufgereinigten PCR-Probe bei 95°C für 10 min denaturiert, in einem Eisbad herunter gekühlt und nach Zugabe von 4 µl des *DIG-High Prime*-Mix bei 37°C über Nacht inkubiert. Die DIG-markierten Sonden wurden bei 4°C gelagert.

3.8.2 Southern Blot

Mittels Southern Blot wurde die Spezifität von PCR-Produkten der Tn-C Spleißvarianten-Untersuchungen überprüft, die aus einer PCR-Reaktion der Patientenproben mit den Oligonukleotiden TEN5 und TEN6 generiert wurden. Nach Auftrennung in einem 1%igem Agarosegel und Transfer der DNA auf eine positiv-geladene Nylon-Membran mittels Kapillarblot wurde diese mit 10 ml „DIG-Easy-Hyb“ Prähybridisierungslösung in einer Hybridisierungsröhre bei 55°C für 30 min inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu maskieren. Nach Zugabe der DIG-markierten Sonde erfolgte die Hybridisierung bei 55°C über Nacht im „HERAhybrid 6“-Hybridisierungssofen. Nach der Hybridisierungsreaktion wurden unspezifisch gebundene Sonden-DNA durch Waschen der Membran in 0,1 x SSC / 0,1 x SDS für 2 x 10 min entfernt. Die weiteren Schritte des Southern Blot wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip des Nachweises besteht in der spezifischen Bindung eines Anti-DIG-Antikörpers an die hybridisierte DIG-Sonde. Zum Nachweis wurde die Membran in 30 ml Anti-DIG-Antikörperlösung für 30 min inkubiert. Die an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase setzte das zugegebene Substrat (NBT/BCIP) unter der Entstehung einer lokalen Farbreaktion um.

3.9 REVERSE LINE BLOT (RLB) ZUR HPV-TYPISIERUNG

3.9.1 Methodik des RLB

Zur HPV-Typisierung der kutanen beta- und gamma-Subgruppe wurde der *Reverse Line Blot* (RLB) eingesetzt (Brink *et al.*, 2005), der ursprünglich in Anlehnung an den Nachweis genitaler alpha-HPV-Typen (van den Brule *et al.*, 2002) modifiziert wurde. Der RLB ist vom Southern Blot abgeleitet und dient zur Identifizierung von DNA-Fragmenten durch spezifische DNA-Sonden. Im Gegensatz zum Southern Blot sind beim RLB spezifische Sonden über eine Amidbindung an eine Membran kovalent gekoppelt. Die *Beta-Gamma-Cutaneous-PCR* (BGC-PCR) des konservierten HPV-L1-Gens ermöglicht die *in vitro* Amplifikation einer großen Anzahl kutaner HPV-Typen der beta- und gamma-Gruppe. Nach der Denaturierung des biotinylierten PCR-Produktes kann die Sonde spezifisch mit dem markierten Einzelstrang hybridisieren. Der Nachweis des gebundenen Amplikons erfolgt indirekt durch die Bindung eines Peroxidase-gekoppelten Streptavidins und anschliessender Belichtung eines Fotofilms mittels Chemilumineszenz-Reaktion (s. Abbildung 7).

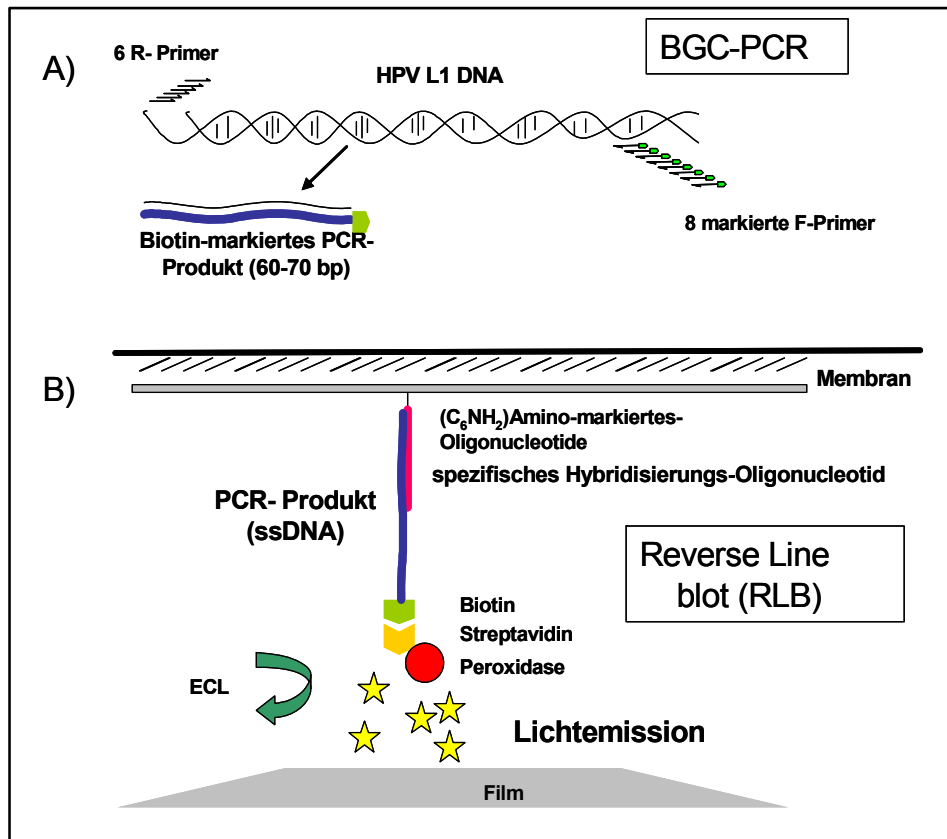


Abbildung 7: Schematische Darstellung der HPV-Typisierung. Mittels *Beta-Gamma-Cutaneous*-PCR (BGC-PCR) werden Biotin-markierte Amplikons des L1-Gens der Beta-Gamma-HPV-Typen synthetisiert (A). Mittels Reverse Line Blot (RLB) erfolgt der Nachweis des Biotin-markierten PCR-Produkts der BGC-PCR nach einer Chemilumineszenzreaktion (B).

3.9.2 Kopplung der HPV-Sonden

Die Sonden (HPV-spezifische 5'-Amino-markierte Oligonukleotide) wurden mittels eines Miniblotter-Systems (MN 45; Immunetics, Cambridge, USA) in parallelen Reihen auf eine negativ geladene Membran aufgebracht und mit dieser kovalent verbunden. Dies erfolgt durch Aktivierung der Carboxyl-beschichteten Nylonmembran mit 16%igem (w/v) EDAC (1-ethyl-3-[dimethylaminopropyl]carbodiimid; Sigma). Für das Auftragen wurden die Oligonukleotide in 150 µl NaHCO₃ (pH 8.4, 0,5 M) gelöst. Nach einminütiger Inkubation wurden die Kanäle entleert und die Membran durch einen Spülschritt mit Wasser und einem zehnminütigen

Waschschrift bei 60°C mit 2x SSPE (20x SSPE: 3,6 M NaCl, 0,2 M NaH₂PO₄, 20 mM EDTA, pH 7,4), ergänzt mit 0,1%igem Natrium-Dodecylsulfat (SDS) (BDH), inaktiviert.

3.9.3 *Beta-Gamma-Cutaneous-PCR (BGC-PCR)*

Die Auswahl der verwendeten Oligonukleotide und Sonden erfolgte nach Brink *et al.* (2005). Die extrahierte DNA wurde anschließend in eine sogenannte *Beta-Gamma-Cutaneous* - Polymerase-Kettenreaktion (BGC-PCR) amplifiziert.

Der PCR-Ansatz enthielt sechs vorwärts (F) und acht 5' Biotin-markierte rückläufige (R) Oligonukleotide. Jede PCR beinhaltete drei Negativkontrollen in Form von 100 ng humaner Plazenta-DNA sowie drei Positivkontrollen die 10, 100 und 1000 Kopien eines HPV8 Plasmids in einem Hintergrund von 100 ng Plazenta-DNA enthielten. Um zu überprüfen, ob DNA erfolgreich aus den Proben isoliert werden konnte, wurde Beta-Globulin DNA mittels der Oligonukleotide PC03 und PC04 für alle Proben amplifiziert.

Pipettierschema 3: BGC-PCR

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
DNA		1–5 µl*
F-Oligonukleotid-Mix (je 12,5 µM)	0,25 µM	1 µl
R-Oligonukleotid-Mix (je 12,5 µM)	0,25 µM	1 µl
dNTP (2 mM)	0,2 mM	5 µl
10x Puffer	1x	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM	0,75 µl
AmpliTaqGold (5 U/µl)	1 U	0,2 µl
Aqua bidest		38,2–34,2 µl *
Gesamtvolumen pro Probe		50 µl

* abhängig von der DNA-Konzentration und Qualität

Die PCR Reaktion erfolgte in dem Thermozykler „Perkin Elmer 9600“ unter Verwendung des aufgeführten Temperaturprotokoll 3.

Temperaturprotokoll 3: Perkin Elmer 9600

Schritt	T [°C]	t [sec]	Δt für ΔT [sec]*	n [Zyklen]
<i>Initiale Denaturierung</i>	94	240		1
<i>Denaturierung</i>	94	20	114	} x 40
<i>Annealing</i>	38	60	120	
<i>Elongation</i>	72	80	78	
<i>Finale Elongation</i>	72	240		1
<i>Abkühlung</i>	4	∞		1

* Temperaturänderung von der vorherigen Temperatur wird in der angegebenen Zeit erreicht

3.9.4 Reverse Line Blot (RLB)

Insgesamt 24 verschiedene Sonden erfassten die kutanen HPV-Typen: 4, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 48, 49, 50, 60 und 65.

Jeweils 10 µl von den bei 95°C hitzedenaturierten, Biotin-markierten PCR-Produkten wurden in 150 µl 2x SSPE/0,5% SDS verdünnt und in einem 90° Winkel zu den Oligonukleotiden auf die Membran aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C für 45 min, gefolgt von zwei 5 min Waschschritten mit 2x SSPE/0,5%igem SDS bei 51°C. Nachfolgend wurde die Membran bei 42°C mit in 2x SSPE/0,5%igem SDS 1:4000 verdünntem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Roche, Basel, Schweiz) für 45 min inkubiert. Es folgten zwei zehnminütige Waschschrritte mit 2x SSPE/0,5%igem SDS bei 42°C mit anschließendem Spülen in 2x SSPE bei Raumtemperatur über 5 min.

Die Nachweisreaktion wurde mit Hilfe von ECL Nachweisreagenzien (Amersham, Buckinghamshire, England) bei zweistündiger Inkubationszeit durchgeführt. Anschließend erfolgte die Dehybridisierung durch zweimaliges Waschen in 1%igem SDS bei 80°C für 30 min und die Inkubation in 20 mM EDTA (pH 8,0) bei Raumtemperatur für 15 min. Nachfolgend wurde die Membran mit 5 ml EDTA (pH 8,0, 20 mM) in Plastik eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt. Die HPV-Konzentration wurde semiquantitativ erfasst. Durch den Vergleich mit den Positivkontrollen aus 10, 100 und 1000 Kopien eines HPV8-Plasmids konnte man die

HPV-Expression in den Proben einteilen in: HPV-Negativ, Sehr schwach (+), Schwach +, Stark ++, Sehr stark +++ / HPV-Positiv.

3.10 GENEXPRESSIONSANALYSEN MITTELS cDNA-MICROARRAY- TECHNOLOGIE

3.10.1 Grundlagen der cDNA-Microarray-Analysen

Die Genexpressionsanalysen wurden mittels cDNA-Microarray-Technologie in der Microarray Facility LFCG in Zusammenarbeit mit Frau Dr. U. Ungethüm (Arbeitsgruppe Dr. R. Schäfer, LFCG, Berlin) durchgeführt. Hierbei wurde der *human chip HG-U133A* (Affymetrix), ein Oligonukleotidarray für die Genexpressionsanalysen, in normaler Haut und Tumoren eingesetzt. Er umfasst mit seinen 22.283 Sondensätzen (*probe sets*) ca. 18.400 Transkripte.

Ein cDNA-Microarray ist eine sehr dichte Anordnung von Desoxynukleinsäuren (DNA) auf einer festen Oberfläche. Bei dieser Technologie wurde die Eigenschaft einzelsträngiger DNA genutzt, dass eine spezifische Bindung (Hybridisierung) nur an die exakt komplementäre Sequenz erfolgt (s. Abbildung 3). Die hohe Selektivität der Hybridisierung ermöglicht sehr spezifische Analysen. Als Sonden wurden DNA-Moleküle mit definierten Sequenzen in einem Array auf einem soliden Träger fixiert. Bei diesem Genchip wurden die Sonden direkt an der Glasoberfläche (Glas-Wafer, Festphase) durch eine kombinierte Methode aus Nukleotidsynthese und Photolithographie synthetisiert. Auf den Affymetrix-Chips wurde jede Sonde (*probe set*) in 11 bis 20 unterschiedlichen Fragmenten (*probe cells*) präsentiert. Ein Fragment besteht aus ca. 25 Oligonukleotiden und existiert in zwei Formen, *Perfect Match* (komplementär zur entsprechenden Sequenz der Proben-cRNA) und *Miss Match* (nicht vollständig komplementär zur entsprechenden Sequenz der Proben-cRNA mit jeweils einem Nukleotidaustausch).

3.10.2 Auswahl und Prozessierung der Patientenproben

Untersucht wurden fünf organtransplantierte Patienten (3 Niere, 1 Herz, 1 Leber), von jedem Patienten wurden Stanzbiopsien mit 4 mm Durchmesser aus Arealen von normaler Haut, Aktinischer Keratose (AK) und Plattenepithelkarzinom (SCC) entnommen (siehe Tabelle 1). Nach histologischer Bestätigung der Diagnose, wurden aus den bei -80°C gelagerten Proben die RNA unter Verwendung des RNeasy® Micro Kit extrahiert. und die cDNA-Microarray-Analyse durchgeführt (siehe Tabelle 1).

Die für die Microarray-Experimente benötigte Gesamt-RNA wurde aus Hautproben (s. Tabelle 1) unter Verwendung von RNeasy® Micro Kit von Qiagen isoliert. Die Gesamt-RNA wurde mit Oligo(dT)-Oligonukleotid, der eine vorgeschaltete T7- Promotor-Sequenz enthielt, in cDNA revers transkribiert. Mittels einer RNA-Polymerase-Reaktion wurde die cDNA in cRNA umgewandelt, wobei biotinylierte Nukleotide für die Synthese verwendet wurden. Nach Fragmentierung der cRNA bei 95°C für 30 min erfolgte die Hybridisierung der Chips. Die Färbung wurde unter Verwendung von Phycoerythrin-gekoppelten Streptavidin durchgeführt. Zum Nachweis der Signale wurde der Agilent Gene Array Scanner 2500 eingesetzt. Das Fluoreszenzsignal kann an der entsprechenden Position innerhalb des Arrays nachgewiesen werden (Hardiman, 2002). Die Signalintensität erlaubt dabei auch die Quantifizierung der entsprechenden Gene in der Probe (Vingron and Hoheisel, 1999).

Die Messung der Signalemission der hybridisierten Arrays erfolgte über den „Agilent G2500A GeneArray Scanner“. Zur Auswertung wurden in einem ersten Schritt die aus der Hybridisierung erhaltenen Daten normalisiert. Dazu wurden die Zahlenwerte der einzelnen Hybridisierungssignale eines Arrays durch die Summe aller Signale dividiert. Das Normalisieren der Arrays ist notwendig, um die verschiedenen cDNA-Microarrays miteinander vergleichbar und von Schwankungen innerhalb eines Microarrays unabhängig zu machen. Nachfolgend können die Gene identifiziert werden, die in den Datensets konsistent differenziell zwischen Tumor- und Normalproben exprimiert sind.

3.10.3 Statistische Auswertung der cDNA-Microarray-Analysen

Die statistische Auswertung der Affymetrix-Genexpressionsanalysen erfolgte unter Verwendung der „Data Mining Tool“ und GeneSpring (Version 6.1) in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. R.J. Kuban. Für die Expressionsintensitäten der einzelnen Gene wurde ein Schätzer bestimmt und in logarithmischer Skalierung angegeben (Wu and Irizarry, 2004). Die statistische Auswertung der geschätzten Expressionsintensitäten erfolgte unter Verwendung eines linearen Modells nach ANOVA (Analysis of Variation; Benjamini *et al.*, 2001) und PAM (Prediction Analysis of Microarray, Tusher *et al.* (2001). Diese Verfahrensweise bei der statistischen Auswertung berücksichtigt sowohl Ausmaß als auch Streuung der differenziellen Genexpression.

3.11 RELATIVE QUANTIFIZIERUNG DER RNA-EXPRESSION

3.11.1 Methodik der quantitativen *real-time* RT-PCR (qPCR)

In dieser Arbeit wurde die Transkriptmenge spezifischer Gene aus verschiedenen Proben untersucht. Um die Expression der ausgewählten Kandidatengene der cDNA-Microarray-Untersuchungen auf mRNA-Ebene verifizieren zu können, wurden mit dieser präziseren Methode 13 Kandidatengene in SCC-Proben untersucht. Andererseits sollte mit dieser Methode die Aktivität von HPV in SCC-Proben nachgewiesen werden. Dabei wurde die Expression von E6/E7 von HPV8, 9 und 15 mittels quantitativen *real-time* RT-PCR-Analysen (qPCR) quantifiziert.

Die in dieser Arbeit zur Quantifizierung der Transkripte angewandte *real-time*-Technologie beruht auf einer modifizierten PCR, bei der die exponentielle Amplifikation der Zielsequenz und der direkte Nachweis der PCR-Produkte simultan in einem Reaktionsgefäß erfolgten und in Echtzeit beobachtet und aufgezeichnet wurden (*real-time* PCR). Die Menge amplifizierter PCR-Produkte wurde über den Farbstoff SYBR Green I[®] nachgewiesen, der an doppelsträngige DNA bindet. Die gemessene Fluoreszenzintensität entspricht der amplifizierten Nukleinsäuremenge.

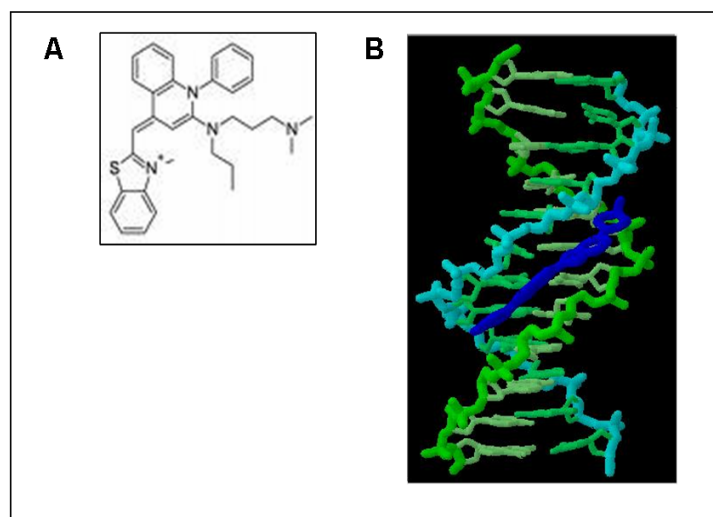


Abbildung 8: Einlagerung von SYBR Green I[®] in die neu gebildete DNA. (A) Molekularstruktur von SYBR Green I, (B) 3-D Modell der Einlagerung von SYBR Green I (dunkelblau) in die kleine Grube der DNA-Helix (<http://cgr.otago.ac.nz/slides/TAQMAN/SLD013.HTM>).

Diese Techniken finden Anwendung in der *real-time* PCR im Roche *LightCycler*[®]. Aus den gemessenen Werten ermittelt eine Recheneinheit eine Kurvenfunktion und legt aufgrund des Signal-Hintergrund-Verhältnisses einen Schwellenwert fest, an dem das Fluoreszenzsignal 10-fach höher als das Hintergrundsignal ist. Der Schnittpunkt von Schwellenwert und Fluoreszenzsignal wird als *Crossing point* (Cp) bezeichnet und dient als Messwert (s. Abbildung 9). Durch die qPCR erhält man für jede PCR-Reaktion einen Cp-Wert. Der Cp-Wert ist abhängig von der Effizienz der PCR und der Menge an eingesetzter DNA. Für die Ermittlung der DNA-Menge einer unbekannten Probe wird eine Standardkurve aus bekannten DNA-Konzentrationen erzeugt und mit Hilfe der erhaltenen Geradengleichung unbekannte Proben bestimmt (*LightCycler Operator's Manual, Version 3.5*).

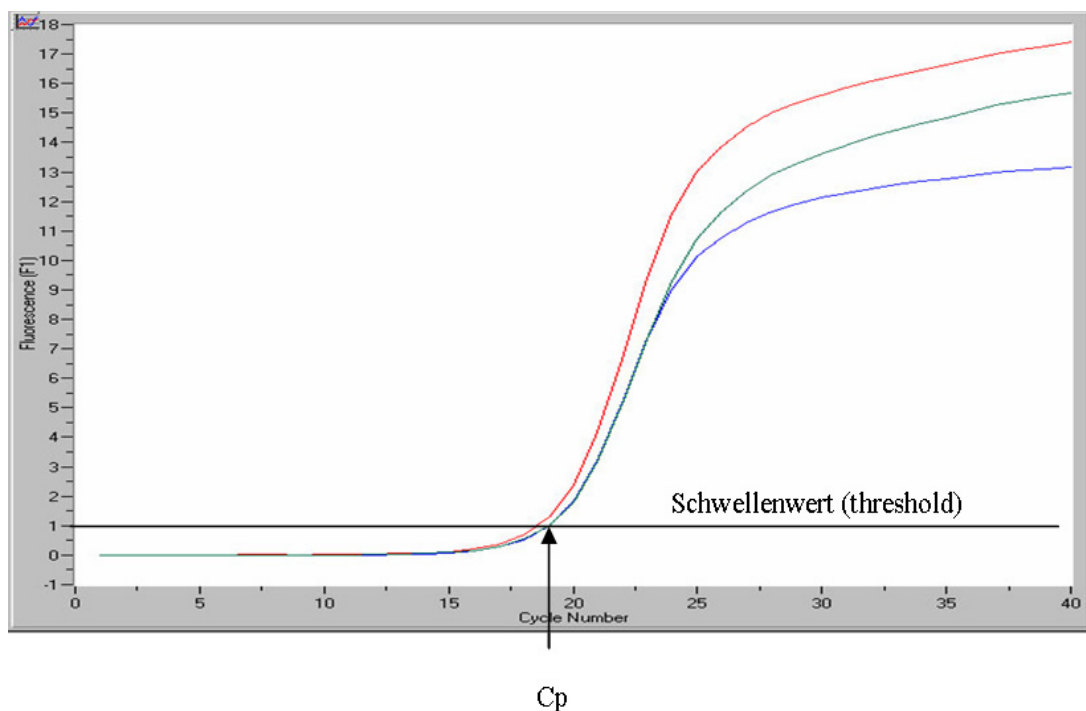


Abbildung 9: Beispiel einer Amplifikationskurve einer qPCR mit dem LightCycler[®]. Fluoreszenzintensität wird gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Cp-Wert: Schwellenwert Zyklus (crossing point). Dies ist der Zeitpunkt der qPCR, an dem die Fluoreszenz des eingelagerten SYBR Green I[®] den Schwellenwert überschreitet. Der Cp-Wert wird von der Software berechnet und nach der Analyse des Laufes angegeben.

3.11.2 Oligonukleotide für die qPCR

Neben den allgemeinen Bedingungen für die Herstellung von Oligonukleotiden wie 35-65% G-C-Gehalt, 18-30 Basen Oligonukleotidlänge, keine Poly(T)-Bereiche bzw. keine palindromischen Sequenzabschnitte oder 3'-Komplementarität (zur Vermeidung von Oligonukleotid-Dimeren), gilt es, noch besondere Kriterien für das Designen von qPCR Oligonukleotiden zu beachten. Zur Steigerung der PCR-Effizienz wurde nach Möglichkeit die Länge des PCR-Produktes nicht größer als 200 bp gewählt, die optimale Länge lag bei 120 bp. Die Schmelztemperatur (T_m) der beiden Oligonukleotide lag bei 60°C. Um genomische DNA-Produkte auszuschließen, wurden die Oligonukleotide möglichst Intron-überspannend an die Exongrenzen gelegt.

3.11.3 Versuchsaufbau der qPCR

Jeder Reaktionsansatz (20 µl) enthielt 50 ng der revers transkribierten cDNA der Probe, 500 nM beider Oligonukleotide (Tabelle 3) 2 µl *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I*[®], x mM MgCl₂ (Tabelle 2) und PCR-Wasser. Im *LightCycler Instrument* wurde die Lösung zuerst zur Aktivierung der *Hot Start*-Polymerase bei 95°C für 10 min denaturiert. Anschließend erfolgten 45 Zyklen jeweils mit Denaturierung (95°C für 10 sec), Oligonukleotidanlagerung bei 60-65°C (abhängig von den Oligonukleotiden) für 5 sec und der Elongation durch die Polymerase (72°C für 10 sec). Die verschiedenen Temperaturen der produktspezifischen Anlagerung der Oligonukleotide sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführt. Der Nachweis des gebildeten PCR-Produktes erfolgte nach Fluoreszenzabsorption bei 470 nm mit einer Emission bei 530 nm im Kanal F1.

Pipettierschema 4: LightCycler[®] PCR-Ansatz mit SYBR Green I[®]

Komponenten	Finale Konzentration	Volumen pro Probe
<i>F-Oligonukleotid (100 µM)</i>	0,5 µM	0,1 µl
<i>R-Oligonukleotid (100 µM)</i>	0,5 µM	0,1 µl
<i>10x LightCycler FastStart Master SYBR Green I inkl. 10 mM MgCl₂</i>	MgCl ₂ (1 mM)	2 µl
<i>MgCl₂ (25 mM)</i>	4 mM	2,4 µl
<i>DNA</i>		*1–5 µl
<i>LC-PCR-H₂O</i>		*14,4–10,4 µl
Gesamtvolumen pro Probe		20 µl

Temperaturprotokoll 4: LightCycler[®] (Roche) Instrument 1.0/1.5

Schritt	T [°C]	t [sec]	ΔT [°C/sec]	n [Zyklen]
<i>Initiale Denaturierung</i>	95	600		1
Amplifikation				
<i>Denaturierung</i>	95	10	}	x45
<i>Annealing</i>	55-65 ^a	5		
<i>Elongation</i>	72	10		
Schmelzkurvenanalyse				
<i>Denaturierung</i>	95	0		1
<i>Hybridisierung</i>	65	15		1
<i>Schmelzen</i>	95	0	0,1	1
<i>Abkühlung</i>	40	∞		

^a Oligonukleotidabhängige Temperatur, siehe Tabelle 3 und 4^b während diesen Schrittes wird die Fluoreszenz gemessen

Im Anschluss an die 45 Amplifikationszyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um sicherzustellen, dass spezifische Amplikons und nicht Nebenprodukte wie z.B. Primermultimere, gemessen wurden. Der Ansatz wurde dafür auf 65°C abgekühlt und mit einem Temperaturanstieg von 0,1°C / sec auf 95°C erwärmt. Zusätzlich wurden die PCR-Produkte durch Gelelektrophorese in einem 3%igem Agarosegel aufgetrennt, um die

Amplikongröße zu dokumentieren. Alle Proben der qPCR wurden in einem Experiment in Doppelbestimmungen gemessen, und jedes Experiment wurde zweimal durchgeführt.

3.11.4 Optimierung der qPCR

Die ausgewählten Oligonukleotide für die qPCR Analysen wurden im ersten Schritt auf ihre optimale Anlagerungstemperatur (T_{ann}) in einer konventionellen PCR überprüft, dabei wurden Temperaturen von 50°C, 55°C, 60°C und 65°C gewählt. Die Spezifität der gebildeten PCR-Produkte wurde für alle Oligonukleotidpaare mittels einer Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarosegel überprüft. Im nächsten Schritt wurde für jedes Oligonukleotidpaar die für eine maximale Effizienz der PCR notwendige optimale MgCl_2 -Konzentration im LightCycler-System bestimmt. Bei der ermittelten optimalen Anlagerungstemperatur lag die optimale MgCl_2 -Konzentration zwischen 3-6 mM. In den Tabellen 1 und 2 sind die optimale T_{ann} und die beste MgCl_2 -Konzentration aller Oligonukleotide-Paare für die qPCR zusammengefasst. Nach Temperatur- und MgCl_2 -Optimierung der ausgewählten Oligonukleotidpaare für die Kandidatengene, wurden die PCR Produkte sequenziert und somit auf ihre Spezifität hin bestimmt.

3.11.5 Relative Quantifizierung mittels qPCR

Bei dieser Form der Quantifizierung wurde die Expression eines Zielgens relativ zu der eines unabhängigen Referenzgens (Haushaltsgen) bestimmt. Ein ideales Referenzgen wird ubiquitär und konstant exprimiert (Horikoshi *et al.*, 1992; Potratz *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das humane Gen *Ribosomales Protein RPS9* verwendet, auf das die relativen Transkriptmengen der zu untersuchenden Gene normiert wurden.

Für die Quantifizierung der Gene wurden Verdünnungsstufen von 0,5 ng - 500 ng eines cDNA-Standards zur Erstellung einer Standardkurve des zu untersuchenden Gens vermessen. Zur Herstellung des cDNA-Standards wurde die mRNA aus SiHa Zellen in cDNA transkribiert und auf eine definierte Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für jede Messung wurde ein neues Aliquot in entsprechender Verdünnung verwendet. Aus der Standardkurve wurden durch Extrapolation die relativen Transkriptmengen der

untersuchten Proben berechnet. Außerdem waren auch Messungen aus unterschiedlichen Experimenten für das gleiche Transkript miteinander vergleichbar.

Als Messwert dient der C_p -Wert, der umgekehrt proportional zur Anzahl der Startkopien in der Probe ist. Zur Erstellung der Standardkurve wurden die C_p -Werte für die verschiedenen Verdünnungsstufen des cDNA-Standards gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge (log ng) aufgetragen. Durch lineare Regression wurde eine Geradengleichung erstellt und mittels der C_p -Werte die log ng-Werte berechnet, die den relativen Transkriptmengen der einzelnen Gene in den Proben entsprechen. Die Transkriptmenge des Ziel-Gens wurde auf die Transkriptmenge des Referenzgens normiert, wodurch gewährleistet war, dass Schwankungen in der Transkriptmenge des Zielgens, hervorgerufen durch methodische Faktoren, herausgerechnet werden konnten.

3.11.6 Statistische Auswertung der qPCR

Für die statistische Auswertung der Daten wurde ein nichtparametrischer Test für unverbundene Proben, der U-Test von Wilcoxon-Mann-Whitney, gewählt. Es wird festgelegt, dass die Nullhypothese auf dem 5% Signifikanzniveau abgelehnt wird, d.h. mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$, wird in 100 Fällen mit gleichem Mittelwert, fünfmal irrtümlich das Urteil „echter“ Unterschied gefällt. Liegt der p-Wert $\leq 0,05$, werden die Vergleichsergebnisse als statistisch signifikant angesehen und die Nullhypothese verworfen.

3.12 IMMUNHISTOLOGISCHE METHODEN

3.12.1 Färbung mit Hämatoxylin und Eosin

Hämatoxylin und Eosin-Färbung (H&E) wurden im histopathologischen Labor der Klinik für Dermatologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt. Die für histologische Untersuchungen verwendete H&E-Färbung dient als histologische Übersichtsfärbung und nutzt die Farbstoffe Hämatoxylin und Eosin. Der Farbstoff ist bei niedrigem pH-Wert positiv geladen und färbt negativ geladene, basophile Strukturen blau (z.B. die DNA des Kernchromatins, die RNA des rauen endoplasmatischen Retikulums, Kernfärbung).

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte (s. 3.12.1) erfolgte ein 4x 2 min Hämatoxylin-Bad (sauer nach Mayer). Anschließend wurden die Schnitte in 2x 2 min in fließendem kaltem Leitungswasser belassen. Weiterhin wurden die Schnitte 2x 2 min 3 % Eosin (wässrig) inkubiert. Nach einer aufsteigenden Alkohol-Reihe wurden die Schnitte mit Harz und Deckglas abgedeckt.

3.12.2 Immunhistochemische Färbung von humanen Geweben

Die Proteinexpression von Tn-C in Hautproben wurde mittels immunhistologischer Färbungen untersucht. Für die Paraffinschnitte wurden die entnommenen Biopsien in 4%igem Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert. Die Paraffineinbettung erfolgte in der Abteilung Histologie der Klinik für Dermatologie und Venerologie, Charité Campus Mitte, Berlin. Mit einem Mikrotom HN40 wurden Gewebeschnitte von 4 µm Dicke gefertigt. Die Paraffinschnitte wurden über Nacht bei 56°C getrocknet.

Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte erfolgte durch Inkubation in seriellen Tauchbädern für jeweils 5 min in 100%igem Xylol (I) und (II), und jeweils 1 min in 100%igem Ethanol (I) und (II), 90% und 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Präparate für 10 min in destilliertem Wasser belassen. Vor der Immunfärbung wurden die Paraffinschnitte für 30 min in vorgekochtem Zitratpuffer (10mM, pH 6.0) bei 95°C in einem Überdruckkochtopf aufgekocht. Hierdurch wurden chemische Quervernetzungen in den Proteinstrukturen durch die Formalinbehandlung wieder aufgespalten, wodurch die Epitope wieder zugänglich werden (Antigen retrieval = Antigen Demaskierung). Anschließend wurden je 100 ml der 1:4000 verdünnten Antikörperlösung mit anti-Tn-C (monoklonaler Antikörper, DB7, Biohit) auf die Schnitte aufgeträufelt und bei Raumtemperatur 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert.

Die Darstellung der Antikörper-Antigen-Komplexe erfolgte durch indirekten Immunphosphatasenachweises mittels der „markierten Steptavidin-Biotin-Methode“ und „Alkaline Phosphatase/RED“ nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieses Nachweisverfahrens beruht auf der hohen Bindungsaffinität des Glykoproteins Steptavidin an Biotin. Ein Biotin konjugierter Sekundärantikörper (goat-anti-mouse) bindet sich dabei an den gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten Primärantikörper. Mit seinen freien Valenzen

bindet das phosphatasekonjugierte Streptavidin an das Biotin des Sekundärantikörpers. Als Chromogen für die Phosphatase wurde das „fuchsin red“-Substrat verwendet.

Bei jeder Serie von Färbungen wurde jeweils eine Positivkontrolle mitgefärbt, um sicherzustellen, dass ein negatives Ergebnis nicht aufgrund einer fehlerhaften Anwendung der Methode entstand. Als Negativkontrolle wurde lediglich der sekundäre, nicht aber der spezifische primäre Antikörper zugegeben.

4 ERGEBNISSE

4.1 IDENTIFIKATION DIFFERENZIELL REGULierter GENE IN KUTANEN

SCC

Die an der Pathogenese von AK und SCC beteiligten Gene wurden mittels cDNA-Microarrays von Tumorgeweben und normaler Haut identifiziert. Die Analyse der Expression von 22.283 Genen in normaler Haut, AK und SCC von 5 organtransplantierten Patienten und 5 immunkompetenten Kontrollen ergaben nach den mathematischen Berechnungsmethoden PAM und ANOVA die im Anhang aufgeführten differenziell regulierten Gene in NMSC (s. 3.10.3).

Die hierarchische Clusteranalyse nach PAM zeigte 299 Gene vor und 118 Gene nach Ausschluss der nicht näher identifizierten ESTs (*Expressed Sequence Tags*) in den Gruppen normale Haut und Tumorgewebe (AK und SCC) spezifisch exprimiert (s. Abbildung 10). Die roten bzw. blauen Markierungen repräsentieren eine erhöhte bzw. eine verringerte Genexpression relativ zum Mittelwert der Expressionsintensitäten. Die Frequenz der Ausreißer der Kreuzvalidierung beträgt 0% für normale Haut, 25% für AK und 20% für SCC, insgesamt konnte eine Frequenz von 13% für alle drei Klassen gemessen werden.

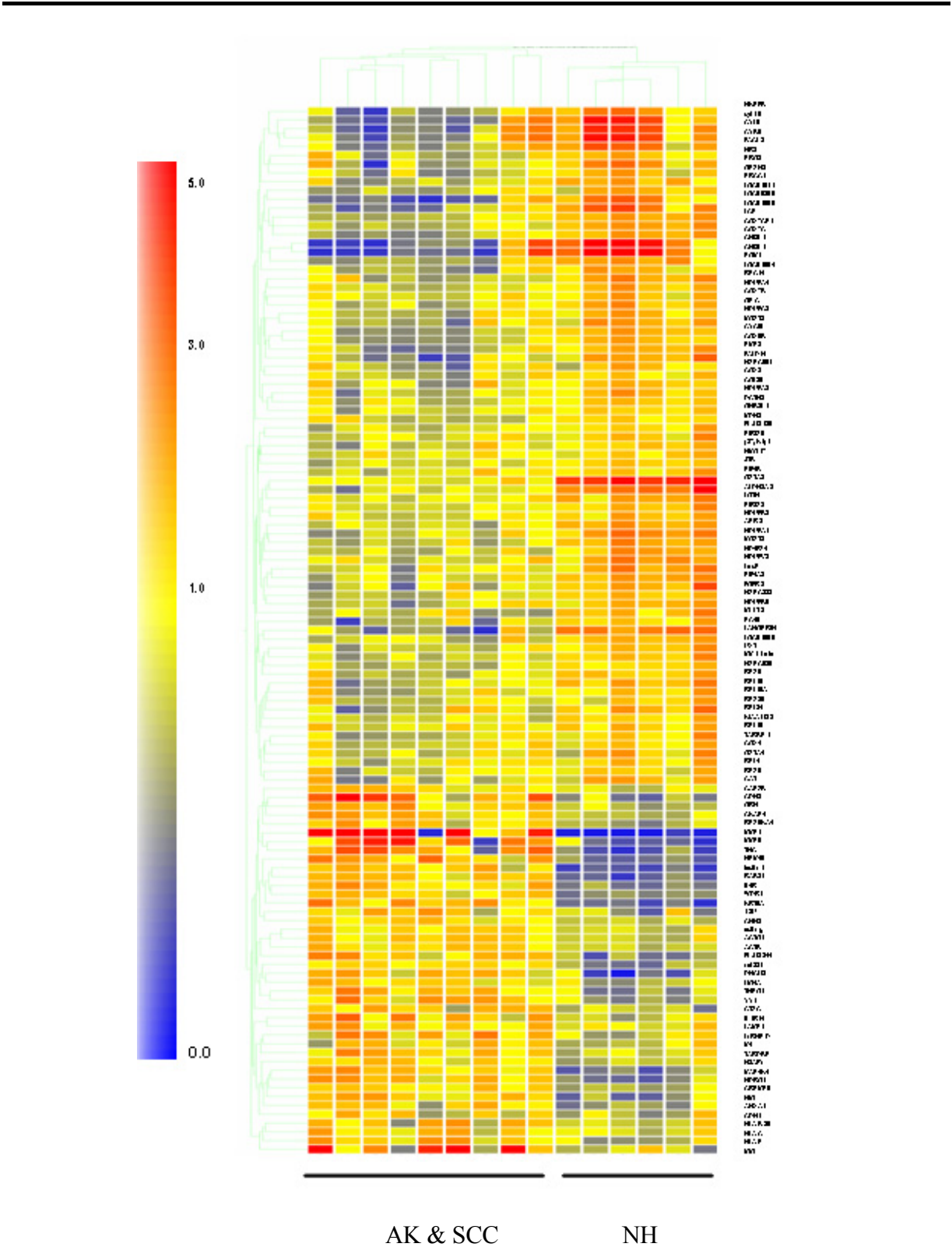


Abbildung 10: Hierarchische Clusteranalyse der differenziell exprimierten Gene. Die erhöhte (rot) bzw. verringerte (blau) Genexpression in Hauttumoren und in normaler Haut (NH) ist relativ zum Mittelwert der Expressionsintensität dargestellt.

Die Ergebnisse der PAM-Analyse zeigten 76 herunterregulierte Gene in NMSC. Von diesen Genen sind 27 (36%) Gene am Stoffwechsel beteiligt, 21 (28%) Gene an der Regulation der Proliferation, 6 (8%) an Zelldifferenzierung sowie Detoxifikation, 5 (7%) Adhäsions-assoziierte Gene, 3 (4%) an der Apoptose und an der Zellkommunikation. Bei weiteren 5 Genen (7%) ist die Funktion nicht bekannt. In Abbildung 11A sind die relativen Anteile der herunterregulierten Gene graphisch dargestellt.

In SCC waren 42 Gene differenziell hochreguliert, von diesen sind 19 (45%) in die Zelladhäsion involviert, 13 (31%) in die Zellkommunikation, 6 (14%) in den Stoffwechsel und jeweils 1 Gen (2%) in die Regulation der Apoptose, bzw. die Proliferation und 2 Gene (5%) in die Zelldifferenzierung (Abbildung 11B). Auffällig war, dass den hochregulierten Genen 6 verschiedene Funktionen zugeordnet werden konnten, dabei machten die an der Zelladhäsion beteiligten Gene den größten Anteil (45%) aus, gefolgt von den Genen (31%), die an der Zellkommunikation beteiligt sind. Im Vergleich dazu waren die Anteile bei den herunterregulierten Genen, denen diese Funktionen zugeordnet werden konnten, insbesondere der an Zelladhäsion (4%) und –kommunikation (7%) Beteiligten, weitaus geringer.

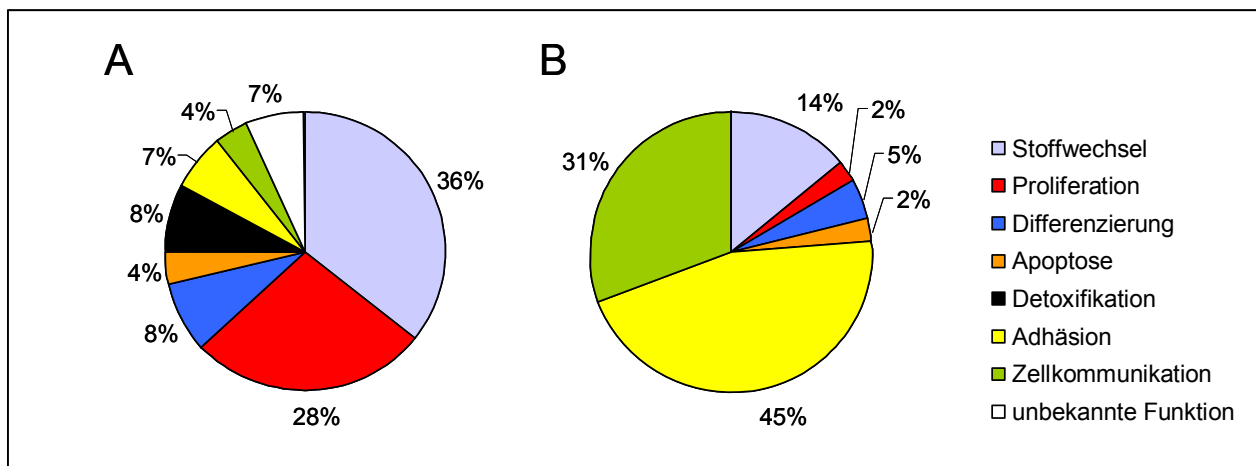


Abbildung 11: Funktionelle Gliederung von 118 in SCC differenziell regulierten Genen nach PAM-Analyse. (A) Prozentsatz der herunterregulierten Gene (n=76), (B) Prozentsatz der hochregulierten Gene (n=42).

Nach der Auswertung der Genexpressionsquelldaten mit der ANOVA-Methode waren 364 Gene einschließlich sieben EST in SCC, verglichen mit normaler Haut, differenziell exprimiert ($p < 0,05$). Der Vergleich zwischen ANOVA und PAM-Analyse zeigte eine Übereinstimmung von 36% der Gene (42 von 118).

Für die weiterführenden Untersuchungen wurden sowohl nach PAM als auch nach ANOVA identifizierte Gene ausgewählt und deren Expression in SCC sowie normaler Haut mittels qPCR untersucht.

4.2 VERIFIZIERUNG DER GENEXPRESSIONSANALYSE MITTELS qPCR

4.2.1 Quantifizierung differenziell hochregulierter Gene in SCC

Zu den in SCC hochregulierten Genen zählten folgende neun Gene: *CDH1*, *GRN*, *IL4R*, *IL1RN*, *MAP4K4*, *MMP1*, *NMI*, *RAB31* und *Tn-C*, die in den cDNA-Microarray-Analysen einen Induktionsfaktor von 1,31-10 in SCC gegenüber normaler Haut aufwiesen (s. Anhang). Die Expression dieser Gene wurde mittels qPCR verifiziert. Die in Abbildung 12 dargestellten Boxplots zeigen den Median, das erste und dritte Quartil sowie die Ausreißer. Die statistische Auswertung erfolgte nach Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test (s. 3.11.5).

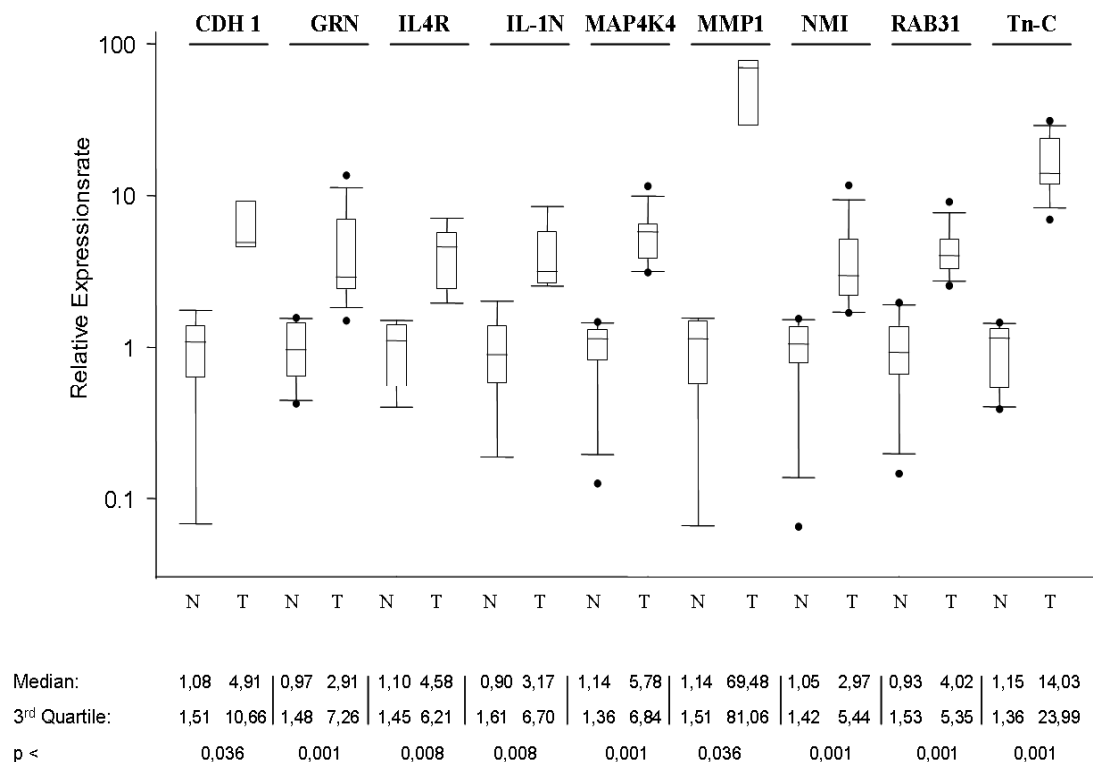


Abbildung 12: Expression der hochregulierten Gene mittels qPCR. Normierung der Genexpression durch RPS9. Dargestellt werden der Medianwert und das 3. Quartil der einzelnen Gene. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test. N, normale Haut; T, Aktinische Keratose (AK) und (SCC) Plattenepithelkarzinom.

Alle untersuchten Gene zeigten eine erhöhte Expression in NMSC-Proben im Vergleich zu normaler Haut und bestätigten so die cDNA-Microarray-Analysen. Die Expression des *MMP1*-Gens war in SCC mit einem Median von 69,48 gegenüber 1,14 ($p < 0,036$) am stärksten induziert verglichen mit normaler Haut. Die geringste Veränderung der mittels qPCR untersuchten Gene wurde für *NMI* mit einem Wert von 1,06 in normaler Haut und 2,97 in SCC gemessen ($p < 0,001$). In der Tabelle 6 werden die Ergebnisse der qPCR mit denen der cDNA-Microarray-Analyse verglichen.

Tabelle 6: Vergleich der Daten differenziell hoch exprimierter Gene zwischen SCC und normaler Haut von cDNA-Microarray und qPCR. Darstellung der Expression relativ zu normaler Haut.

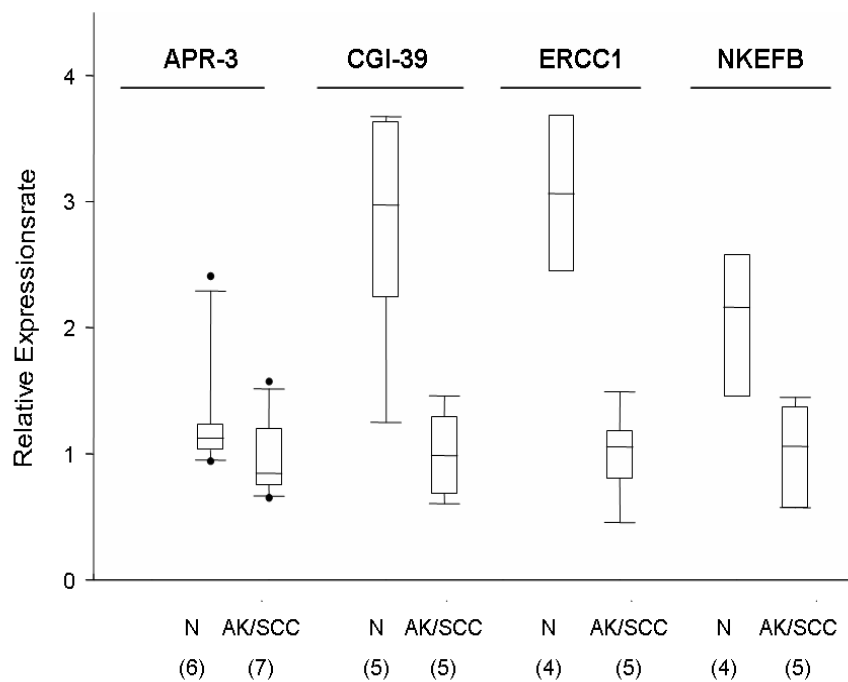
Genname	Symbol	Funktion	cDNA-Array (T/N)	Real-time RT-PCR (T/N)	Bestätigung
E-Cadherin	<i>cdh1</i>	Calcium abhängiges Zell-adhäsionsmolekül	geringe Induktion	4,55-fach	positiv
Granulin	<i>GRN</i>	Wachstumsfaktor	1,77-fach	3,00-fach	positiv
IL-4 Rezeptor	<i>IL4R</i>	Differenzierung von T- und B-Lymphozyten	2,41-fach	4,12-fach	positiv
IL-1-Rezeptor-antagonist	<i>IL-1RN</i>	Signaltransduktionsmolekül	1,75-fach	3,52-fach	positiv
MAP4-Kinase4	<i>MAP4K4</i>	Signaltransduktionsmolekül	2,65-fach	5,07-fach	positiv
Matrixmetalloproteinase 1	<i>MMP1</i>	Abbauprozessen der ECM	27,84-fach	60,95-fach	positiv
N-myc-STAT-Interaktor	<i>NMI</i>	Signaltransduktionsmolekül	2,33-fach	2,83-fach	positiv
RAB31	<i>RAB31</i>	RAS-Protoonkogenfamilie	3,30-fach	4,32-fach	positiv
Tenascin-C	<i>Tn-C</i>	Adhäsionsmolekül, Tumorprogression	4,60-fach	12,20-fach	positiv

N, normale Haut; T, Aktinische Keratose (AK) und (SCC) Plattenepithelkarzinom

Der Genexpressionsunterschied zwischen den SCC-Proben und normaler Haut war für alle untersuchten Gene höher mittels qPCR im Vergleich zu den cDNA-Microarray-Analysen (s. Tabelle 6). Beispielsweise war die Expression von E-Cadherin nur schwach in SCC-Proben induziert nach den cDNA-Microarray-Analysen, mittels qPCR jedoch ca. um den Faktor 5 erhöht.

4.2.2 Quantifizierung differenziell herunterregulierter Gene in SCC

Zu den in SCC gegenüber normaler Haut herunterregulierten Genen in cDNA-Microarrays zählten folgende vier Gene: *APR3*, *CGI-39*, *ERCC1* und *NKEFB*. Die Genexpression in SCC war um den Faktor 1,43-2,50 herunterreguliert (s. Anhang). Mittels qPCR wurde anschließend die Expression dieser Gene näher untersucht (s. Abbildung 13). In den Boxplots sind der Median, das erste und dritte Quartil und die Ausreißer dargestellt.



Median:	1,12	0,85	2,97	0,99	3,06	1,05	2,16	1,00
3. Quartile:	1,53	1,29	3,65	1,35	3,83	1,29	2,71	1,40
p <	0,138 (n.s.)		0,016		0,016		0,111 (n.s.)	

Abbildung 13: Expressionsrate der herunterregulierten Gene mittels qPCR. Normierung der Genexpression durch *RPS9*. Dargestellt werden der Medianwert und das 3.Quartil der einzelnen Gene. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test. N, normale Haut; Aktinische Keratose (AK) und Plattenepithelkarzinom (SCC).

CGI-39 und *ERCC1* zeigten eine signifikant geringere Expression in SCC verglichen mit normaler Haut und bestätigten somit die cDNA-Microarray-Analysen (s. Tabelle 7). Die

Expression von *CGI-39* war mit einem Median von 2,97 gegenüber 0,99 in normaler Haut in SCC deutlich herunterreguliert ($p < 0,016$). Ebenso war *ERCC1* mit einem Median von 3,06 bzw. 1,05 in SCC niedriger exprimiert als in normaler Haut ($p < 0,016$).

Die beiden im cDNA-Microarray herunterregulierten Gene *ARP-3* und *NFEKB* zeigten in der qPCR Analyse in SCC zwar eine geringere Expression gegenüber normaler Haut (Median 1,12 zu 0,85, $p = 0,138$ und 2,16 zu 1,0, $p = 0,111$), die statistisch jedoch nicht signifikant war. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der qPCR im Vergleich zu denen des cDNA-Microarray zusammengefasst.

Tabelle 7: Vergleich der Genexpression herunterregulierter Gene in SCC Gewebe verglichen mit normaler Haut und Vergleich der Daten von cDNA-Microarray und qPCR.

Genname	Symbol	Funktion	cDNA-Array (N/T)	Real-time RT-PCR (N/T)	Bestätigung
Apoptose related protein-3	<i>APR3</i>	Apoptose	-1,85-fach	-1,32-fach	positiv, nicht signifikant
CG-39-Protein	<i>CG-39</i>	Signaltransduktion, Transkription	-1,43-fach	-3,00-fach	positiv
excision repair cross-complementing rodent repair deficient	<i>ERCC1</i>	Reperaturprotein der Genexpression	-1,79-fach	-2,91-fach	positiv
Human natural killer cell-enhancing factor	<i>NKEFB</i>	Reduktion von Hydrogenperoxid	-2,50-fach	-2,13-fach	positiv, nicht signifikant

N, normale Haut; T, Aktinische Keratose (AK) und (SCC) Plattenepithelkarzinom

85% der ausgewählten Gene (9 hochregulierte und 4 herunterregulierte Gene) bestätigten in der qPCR-Analyse die Daten der cDNA-Microarray-Analyse. Somit zeigten 11 von 13 analysierten Genen mittels qPCR eine differenzielle Expression.

4.2.3 Quantifizierung der mRNA-Expression von MMP1 und RAB31 in den Entwicklungsstadien von SCC

Die Expression der Gene Metalloproteinase-1 *MMP1* und des zur RAS-assoziierten Proteins *RAB31* wurde in einem größeren Probenkollektiv in Abhängigkeit der Progression des NMSC über diagnostizierte AK zu SCC bestimmt. Beide Gene waren in den cDNA-Microarray-Analysen differenziell in NMSC hochreguliert gegenüber normaler Haut (s. 4.2.1). Mittels qPCR konnte deren Expression analog zum Progressionsstadium in AK, bzw. SCC differenziell reguliert bestätigt werden (s. Abbildung 14).

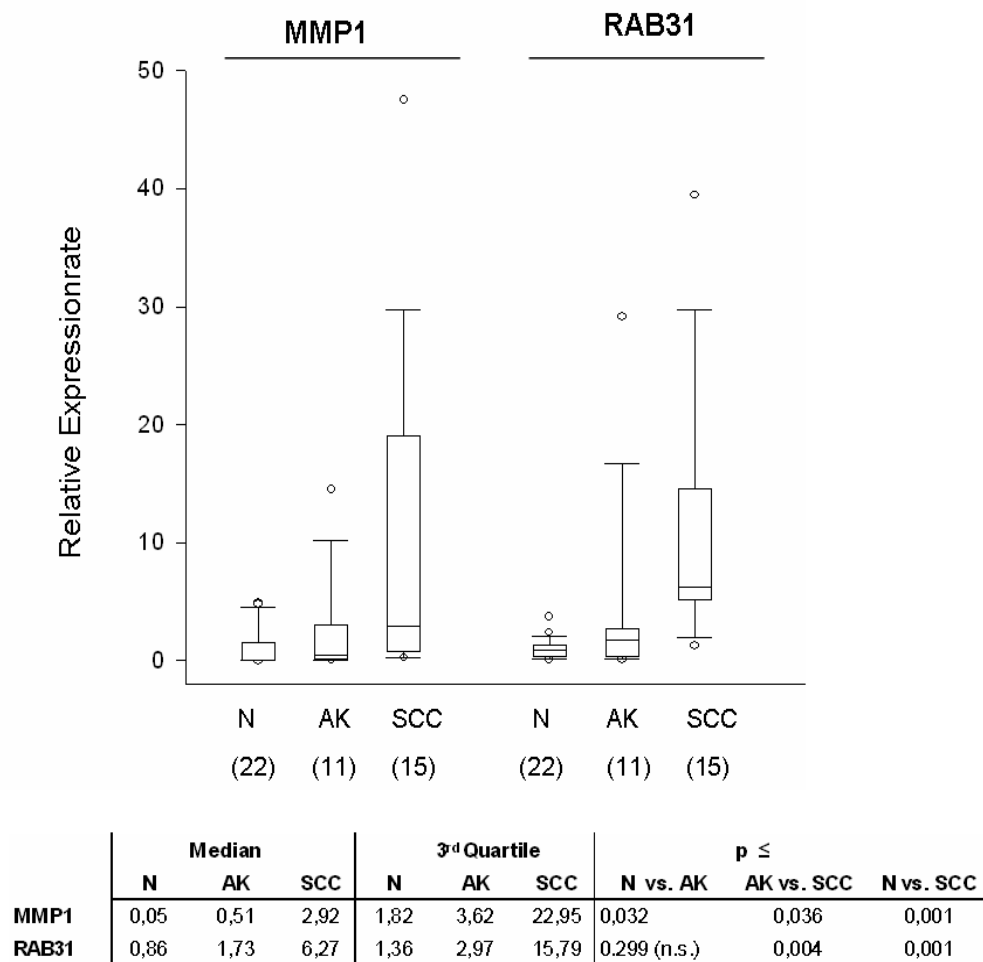


Abbildung 14: Expressionsrate von *MMP1* und *RAB31* mittels qPCR. Normierung der Genexpression durch RPS9. Dargestellt werden der Medianwert und das 3. Quartil der einzelnen Gene. Die statistische Auswertung erfolgte dem nach Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test. N, normale Haut; Aktinische Keratose (AK) und Plattenepithelkarzinom (SCC).

Der Median der relativen mRNA Expression von *MMP1* gegenüber dem Referenzgen *RPS9* war in SCC mit 2,92 signifikant höher als in AK mit 0,51 bzw. in normaler Haut mit 0,05. RAB31 ist in SCC signifikant höher exprimiert (Median = 6,27) als in AK mit einem Median von 1,73, bzw. in normaler Haut (Median = 0,86).

Der Vergleich der Daten aus der qPCR und der cDNA-Microarray-Analyse der relativen Expression in normaler Haut und NMSC-Gewebe ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Vergleich der Daten differenziell exprimierter Gene zwischen SCC und normaler Haut von cDNA-Microarray und qPCR. Vergleich der Genexpression in NMSC Gewebe getrennt nach AK und SCC relativ zu normaler Haut.

Genname	Symbol	Funktion	c-DNA Array (T/N)	real-time RT-PCR (T/N)	
				AK	SCC
Matrixmetalloproteinase 1	<i>MMP1</i>	Abbauprozesse der ECM	27,84-fach	10,20-fach	58,40-fach
RAB31	<i>RAB31</i>	RAS-Protoonkogenfamilie	3,30-fach	2,01-fach	7,29-fach

N, normale Haut; T, Aktinische Keratose (AK) und (SCC) Plattenepithelkarzinom

Der Induktionsfaktor für *MMP1* in SCC verglichen mit normaler Haut war in der qPCR deutlich höher (58,4-fach) als im cDNA-Microarray (27,8-fach), für AK jedoch nicht (10,2-fach). Ein ähnliches Muster fand sich für RAB31, das in NMSC Gewebe im cDNA-Microarray 3,30-fach höher exprimiert als in normaler Haut auffiel, jedoch mittels qPCR nur in SCC ähnlich hohe Werte erreichte (7,29-fach) nicht jedoch in AK (2,01-fach).

4.3 EXPRESSION VON Tn-C UND DESSEN SPLEIBVARIANTEN IN SCC

4.3.1 Quantifizierung der Tn-C mRNA-Expression mittels qPCR

Nach cDNA-Microarray- und qPCR-Analysen zeigte *Tn-C* eine 14-fach erhöhte Expression in SCC. Um die Expression in den Entwicklungsstadien AK zu SCC genauer zu untersuchen, wurde die Anzahl der zu untersuchenden Hautproben für normale Haut auf 25, AK auf 19 und SCC auf 22 Proben erhöht. Alle 66 Hautproben wurden mittels qPCR auf ihren Expressionsgrad überprüft.

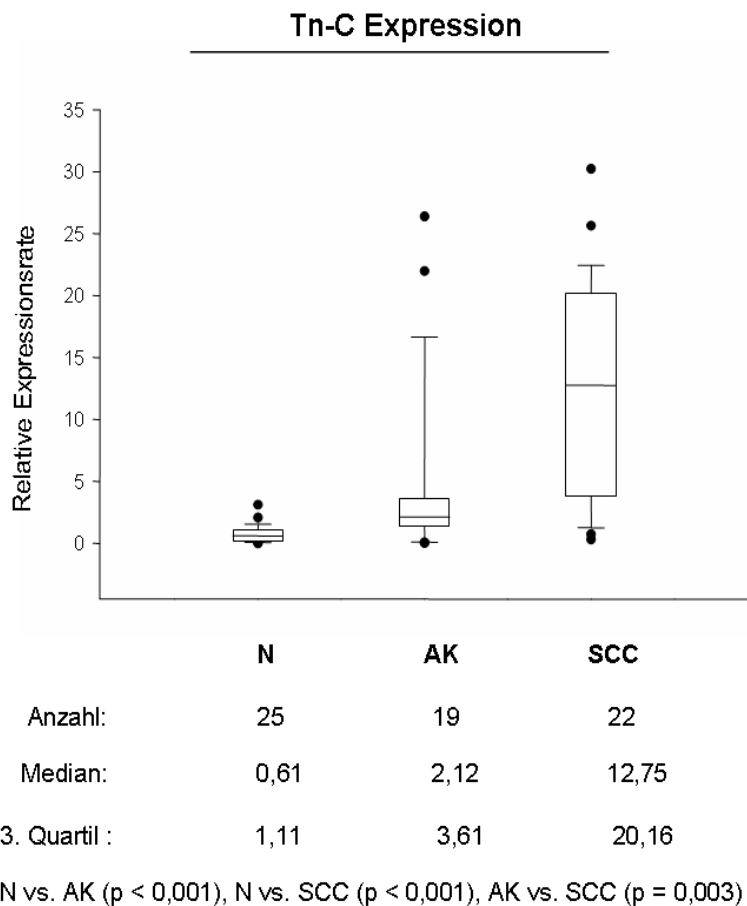


Abbildung 15: Expressionsrate des *Tn-C*-Gens. In 25 normalen Hautproben (N), 19 Aktinischen Keratosen (AK) und 22 Plattenepithelkarzinomen (SCC) wurde die Tn-C mRNA Expression mittels qPCR untersucht. Normierung der Genexpression durch RPS9. Dargestellt sind der Medianwert und das 3. Quartil der einzelnen Gene. Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, wurde eine erhöhte Expression von Tn-C mRNA in AK *versus* normaler Haut mit einem Median von 2,12 bei einer Signifikanz von $p < 0,0001$ nachgewiesen. In Proben der AK und SCC wurde ein Anstieg der Expressionsrate auf einen Median von 2,12 bzw. 12,75 mit einer Signifikanz von $p < 0,0001$ bzw. $p = 0,003$ gemessen.

4.3.2 Untersuchung von Tn-C Spleißvarianten

Die unterschiedlichen Isoformen von *Tn-C* entstehen durch alternatives Spleißen der prä-mRNA zwischen TNfn5 und TNfn6. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Transkripte in der Anzahl der kombinierten Exons. Die Anwesenheit von Tn-C mRNA und deren unterschiedlichen Spleißvarianten wurde in einer konventionellen PCR mit TEN5 und TEN6 Oligonukleotiden durchgeführt, dabei wurden 20 normale, 16 AK- und 16 SCC-Hautproben untersucht. Abbildung 16 zeigt exemplarisch die PCR-Produkte von 5 Normalhaut-Proben, 5 AK-Proben und 3 SCC-Proben, die in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Es waren Spleißvarianten von Tn-C mit einem Molekulargewicht von 332 bp, 605 bp, 2243 bp nachweisbar.

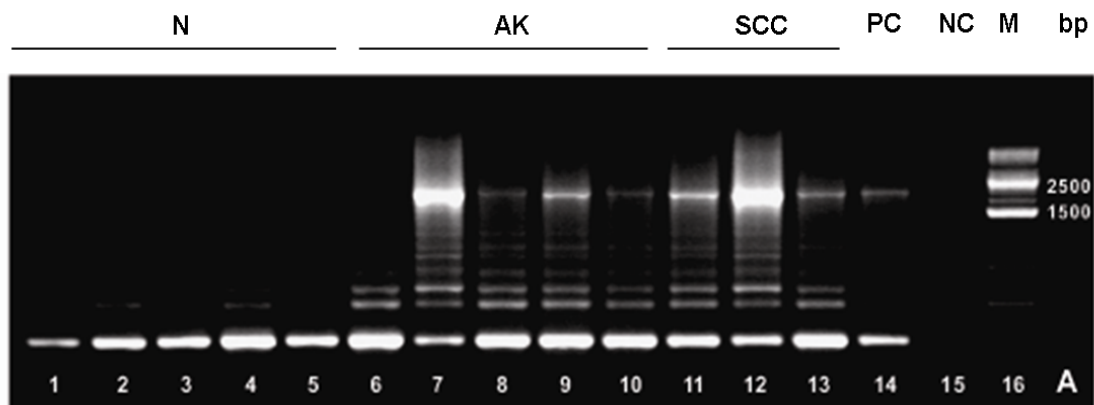


Abbildung 16: Expression von *Tn-C* Spleißvarianten in SCC, AK *versus* normale Haut. Die PCR-Produkte der Größe 332, 605 und 2243 bp im Agarosegel. N: normalen Hautprobe; AK: Aktinische Keratosen; SCC: Plattenepithelkarzinome; M: DNA-Marker (250 bp-Leiter); PC: Positivkontrolle; NC: Negativkontrolle.

Das gespleißte *Tn-C* mRNA Transkript mit einer Größe von 332 bp wurde in 70% aller normalen Hautproben, 94% aller AK- und 100% aller SCC-Proben gefunden. Eine große Anzahl verschiedener Spleißvarianten mit unterschiedlichem Molekulargewicht konnte überwiegend in den NMSC-Gewebe gefunden werden. Die Spleißvariante mit der

Produktgröße von 605 bp wurde in sieben von 20 normalen Hautproben (35%) ermittelt. Dagegen konnte eine vermehrte Expression des 605 bp-Fragments, in AK (94%, $p<0,01$) und allen untersuchten SCC-Proben (100%, $p<0,001$) nachgewiesen werden. Die größte Spleißvariante mit 2243 bp wurde, verglichen mit den Proben normaler Haut (5%), signifikant häufiger in Tumorgewebe von AK (63%, $p<0,001$) und SCC (88%, $p<0,001$) exprimiert.

4.3.3 Southern Blot-Analyse der Tn-C Spleißvarianten

Mittels *Southern Blot* Technik wurden die Produkte der Spleißvarianten-PCR auf Spezifität untersucht. Dazu wurden jeweils drei cDNA Proben von normaler Haut, bzw. SCC mit TEN5 und TEN6 Oligonukleotiden amplifiziert und in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Exemplarisch sind die Tn-C Spleißvarianten mit einer Fragmentgröße von 332, 605 und 2243 bp nach Auftrennung im Agarosegel in Abbildung 17 A dargestellt.

Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran folgte die Hybridisierung mit einer Biotin-markierten Tn-C-spezifischen Sonde, die zuvor mittels PCR mit den Oligonukleotiden TN-F, TN-R und Biotin-gekoppelten Oligonukleotiden hergestellt wurde. Die Substratreaktion bestätigt die Banden der PCR-Reaktion auf der Nitrocellulosemembran (Abbildung 17 B).

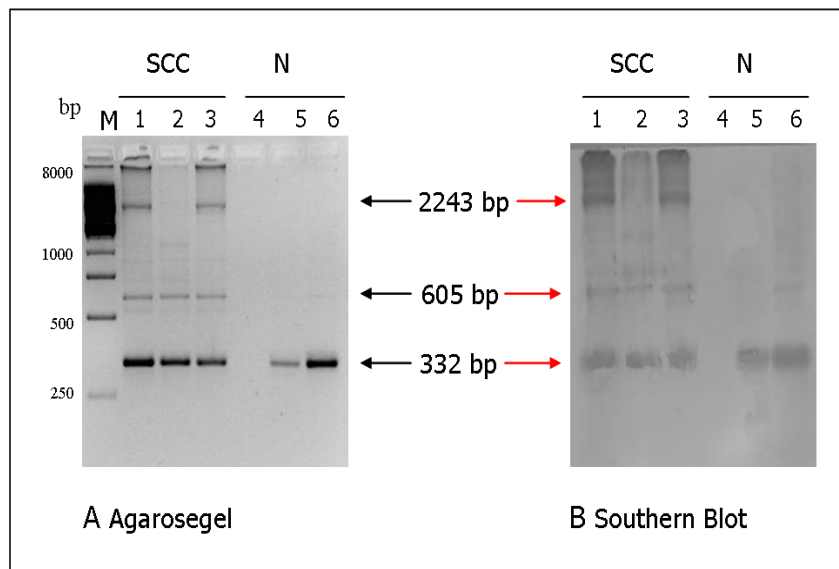


Abbildung 17: Southern Blot-Analyse zur Bestätigung der Spezifität der PCR Produkte. (A) die PCR-Produkte der Größe 332, 605 und 2243 bp im Agarosegel und (B) die entsprechenden Southern-Blot Banden auf der Nitrocellulosemembran. N: normale Hautprobe; SCC: Plattenepithelkarzinomen; M: DNA-Marker (250 bp-Leiter).

4.3.4 Sequenzierung der Tn-C Spleißvarianten

Die mittels PCR amplifizierten Tn-C Spleißvarianten mit der Fragmentgröße von 332, 605 und 2243 bp wurden für die Spleißvariantenanalyse nach Aufreinigung im Agarosegel sequenziert.

Die Sequenzanalysen bestätigten die unterschiedlichen Tn-C Spleißvarianten mit den Größen 332 bp, 605 bp und 2243 bp (Gen Acc.nr. NM_002160). In Abbildung 18 sind die einzelnen Exons schematisch dargestellt, die weißen Exonboxen stellen die alternative Spleißregion dar. Die PCR Produkte 332 bp, 605 bp und 2243 bp sind als Balken dargestellt, dabei werden die in grau markierten Bereiche transkribiert und die weißen Regionen ausgelassen. Beim kleinen Fragment der Größe 332 bp werden die Exons 10 bis 16 inkl. AD2/1-Region heraus gespleißt, dem 605 bp Fragment fehlen Exon 10 bis 15 incl. AD2/1-Region. Das Fragment mit der Größe 2243 bp schließt alle Exons außer AD2/1 mit ein (s. Abbildung 18).

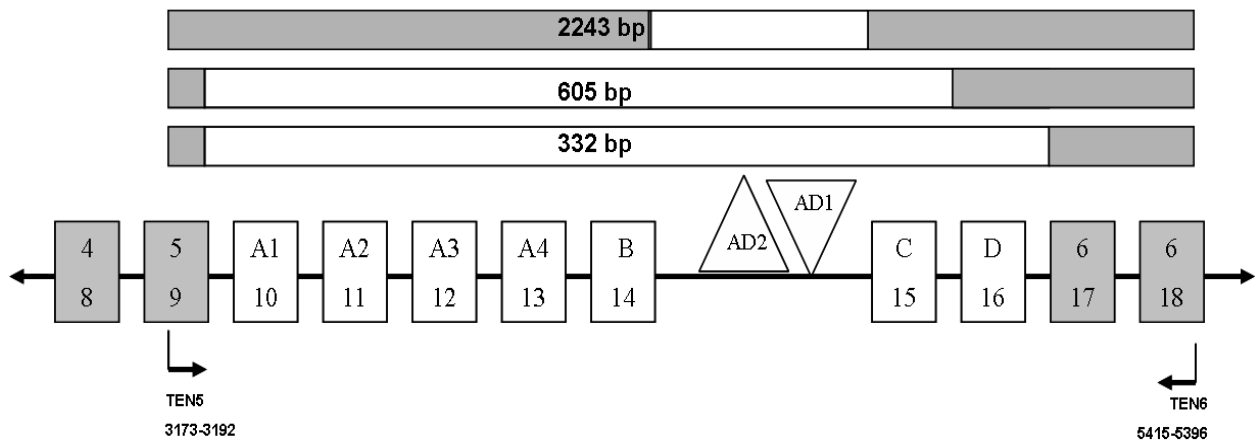


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Sequenzierungsergebnisse nach den Alignment-Analysen von Tn-C. Die PCR Produkte 332 bp, 605 bp und 2243 bp sind als Balken dargestellt. Die graue Region wird transkribiert, die weiße Region wird heraus gespleißt.

4.3.5 Immunhistologischer Nachweis von Tn-C

Zum Nachweis der Proteinexpression von Tn-C wurden Paraffinschnitte aus normaler Haut, bzw. AK, SCC immunhistochemisch angefärbt. Dazu wurden Maus-anti-Tn-C monoklonale Antikörper und mit alkalischer Phosphatase gekoppelte anti-Maus Antikörper verwendet. Während in der Epidermis, dem *Stratum papillare* und dem *Stratum reticulare* normaler Haut kein Tn-C Protein nachweisbar war, zeigte sich in vaskulären Endothelzellen und (fibrösen) Zellen des Haarschaftes eine deutliche Färbung des Tn-C Proteins (s. Abbildung 19).

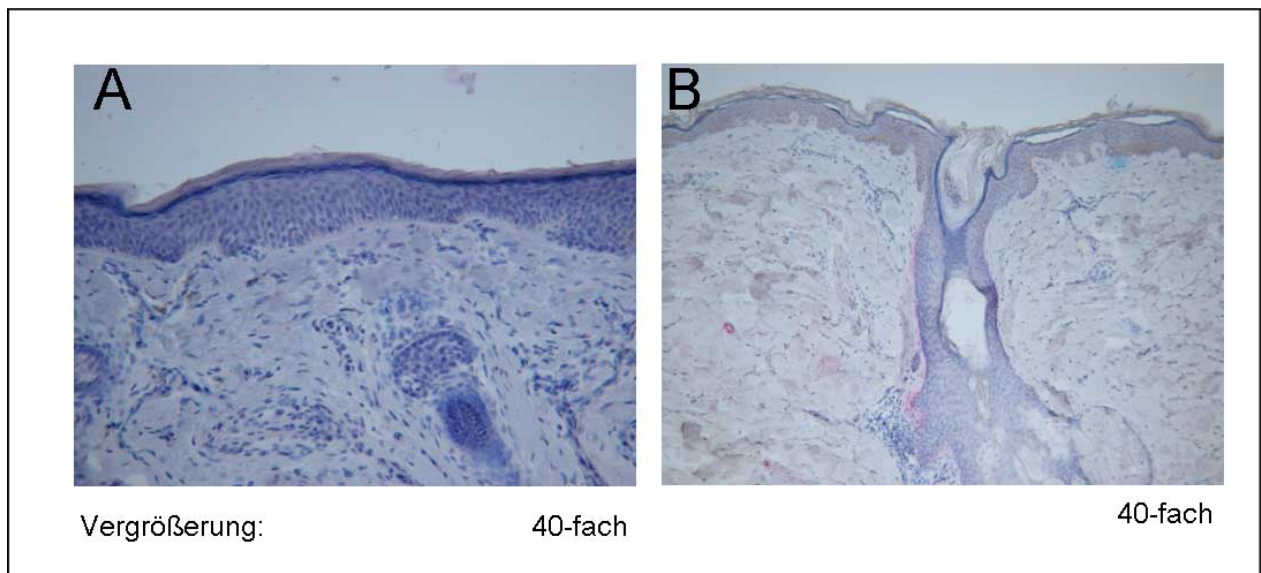


Abbildung 19: Immunhistologische Färbung von Tn-C in normaler Haut. Tn-C konnte nicht in der Epidermis (A) nachgewiesen werden, jedoch in vaskulären Endothelzellen und fibrösen Zellen des Haarschaftes (B).

Bei den AK-Proben lag ein anderes Färbungsmuster vor. Zellen in kleinen Arealen der Papillarschicht der Dermis waren positiv für das Tn-C Protein (s. Abbildung 20). Es zeigte sich jedoch, weder in der Epidermis noch dem *Stratum retikulare* der Dermis eine Färbung für das Tn-C Protein.

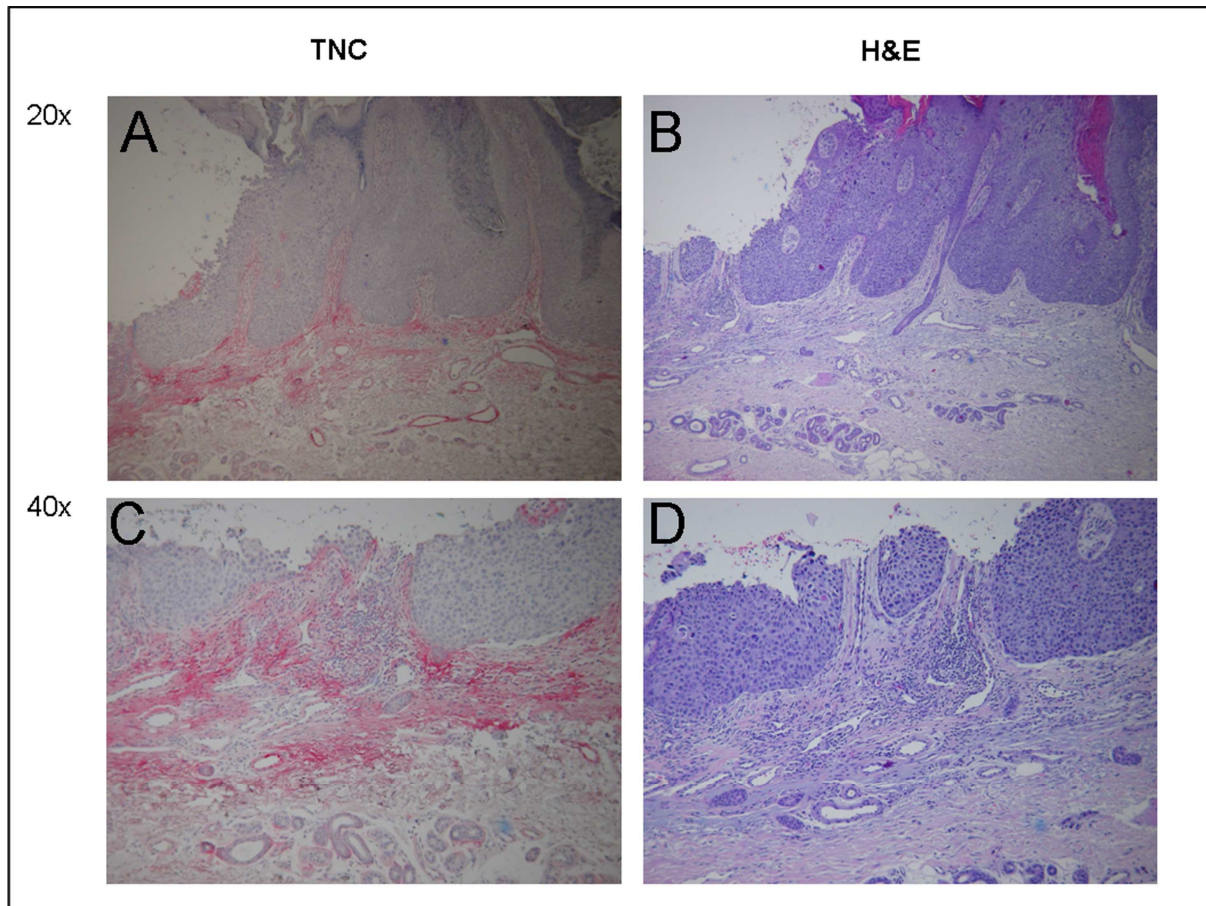


Abbildung 20: Immunhistologische Färbung von Tn-C von AK. (A) und (C) Tn-C –Färbung (rot). Tn-C konnte nicht in der Epidermis und Geflechschicht der Dermis nachgewiesen werden, in der Papillarschicht der Dermis konnte das Protein Tn-C aufgezeigt werden (A u C). (B) und (D) entsprechende H&E-Färbung.

In SCC-Proben konnte eine erhöhte Expression von Tn-C Protein beobachtet werden, große Bereiche des *Stratum papillare* und *Stratum reticulare* der Dermis waren positiv für Tn-C (s. Abb. 21A/C). Teilweise konnte sogar in einigen Proben das Tn-C Protein im Cytoplasma von dysplastischen Zellen, und teilweise von basalen Tumorzellen der Invasionsfront nachgewiesen werden (s. Abbildung 21 B/D).

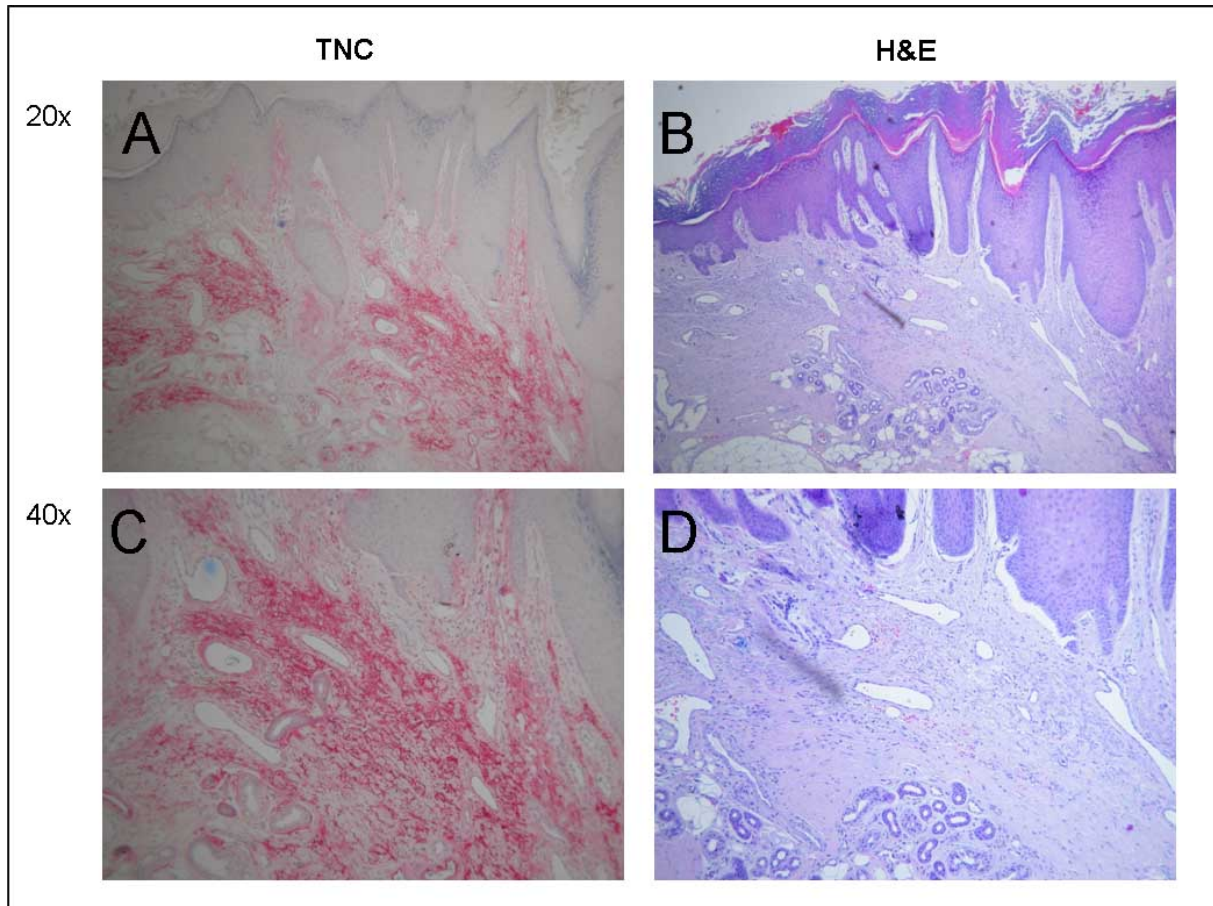


Abbildung 21: Immunhistologische Färbung von Tn-C von SCC-Gewebe. (A) und (C) Tn-C – Färbung. Das Protein Tn-C konnte in der Papillarschicht und der Geflechschicht (A) und im Cytoplasma (C) aufgezeigt werden. (B) und (D) entsprechend H&E-Färbung.

In histologisch normalen Arealen der AK-oder SCC-Schnitte konnte das Tn-C Protein nicht nachgewiesen werden. Diese Bereiche eigneten sich somit zur internen Kontrolle. In maligne veränderten Abschnitten der AK- und SCC-Proben waren die Tn-C positiven Zellen bandförmig angeordnet mit invasiv wachsenden Bereichen des NMSC assoziiert. Im *Stratum reticulare* war eine große Anzahl Zellen positiv gefärbt, dagegen konnte im *Stratum papillare* eine differierende Anzahl positiver Zellen beobachtet werden.

4.4 NACHWEIS UND AKTIVITÄT VON HPV IN NMSC

4.4.1 Nachweis von HPV-Typen mittels RLB

Für die HPV-Typisierung wurde die DNA der 31 Patientenproben untersucht (s. Tabelle 2). Die Produkte der BGC-PCR dieser Proben wurden mittels *Reverse Line Blots* für 24 HPV-Typen bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in 57% der gesunden Hautproben, 92% der benignen Warzen und 83% der NMSC immunsupprimierten Patienten die DNA von 24 verschiedenen kutanen HPV-Typen nachgewiesen. Der in Abbildung 22 dargestellte repräsentative RLB wurde von 29 NMSC-Proben (1-29) der 6 Patienten, 3 Negativkontrollen (30-32) und 3 Positivkontrollen mit 10, 100 und 1.000 Kopien HPV8 in einem Hintergrund von 1 ng/100 ng Plazenta DNA (33-35) durchgeführt.

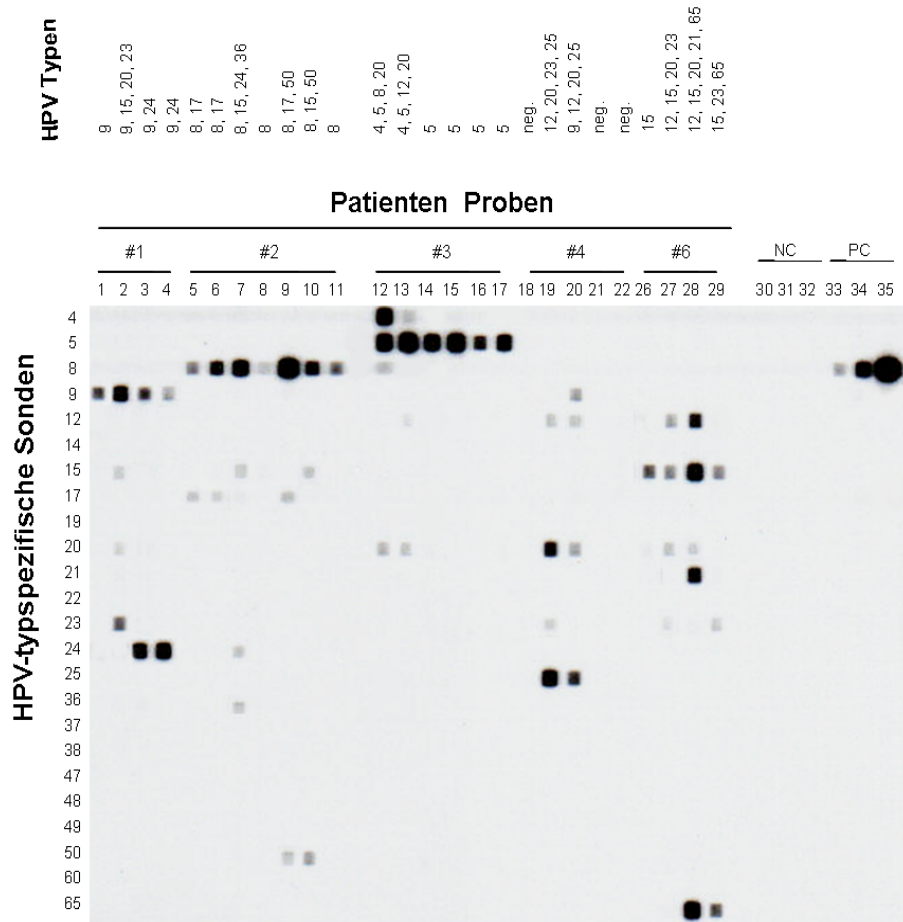


Abbildung 22: Reverse Line Blot (RLB) HPV-Typisierung. 29 NMSC-Proben (1-29), 3 Negativkontrollen (30-32), 3 Positivkontrollen von 10, 100 und 1000 Kopien HPV8 in einem Hintergrund von 1 ng /100 ng Plazenta DNA (33-35) wurden auf das Vorhandensein von 24 HPV-Typen untersucht (Dang et al., 2006). neg, negativ; NC, negativ Kontrolle; PC, positive Kontrolle.

Die Ergebnisse der HPV-Typisierung werden in Tabelle 9 aufgelistet. Es wurden 14 unterschiedliche HPV-Typen in 25 von 31 Biopsien der 6 immunsupprimierten Patienten nachgewiesen. Einzelinfektionen konnten in 8 Proben der 6 Patienten gezeigt werden. Mehrfachinfektionen mit unterschiedlichen HPV-Typen wurden in 17 Proben nachgewiesen. Das Muster der HPV-Typen unterschied sich in jedem einzelnen Patienten, allerdings konnte in den unterschiedlichen Proben der Patienten #1 bis #4 konsistent ein bestimmter HPV-Typ nachgewiesen werden (s. Tabelle 3).

Tabelle 9: Nachweis kutaner HPV-Typen mittels Reverse Line Blot (DNA) und qPCR (RNA).

Nr.	Bez.	Pat.-Nr	G./Alter	Histologie	Lokalisation	DNA-HPV Typisierung (BGC-PCR)	RNA real-time RT-PCR			
							Untersuchte HPV Typen	S9	E6 pos. of HPV	Bak
1	1N	1	m/61 J.	normal	Wange	9 ⁺	HPV9,15	+	-	++
2	1T			AK, bowenoid	Wange	9 ⁺⁺ ,15 ⁺ ,20 ⁺ ,23 ⁺		+++	15, 9 ^a	+++
3	3N			normal	Unterarm	9 ⁺ ,24 ⁺⁺		+++	-	+++
4	3T			SCC	Unterarm	9 ⁺ ,24 ⁺⁺		+++	9	+++
5		2	m/54 J.	AK	Wange	8 ⁺ ,17 ⁺	HPV8	+++	-	+++
6				normal	Wange	8 ⁺ ,17 ⁺		+++	-	+++
7				SCC	Wange	8 ⁺ ,15 ⁺ ,24 ⁺ ,36 ⁺		+++	-	+++
8				Vv	Hand	8 ⁺		+++	-	+++
9				Vv	Stirn	8 ⁺⁺ ,17 ⁺ ,50 ⁺		+++	-	+++
10				Vv	Ohr	8 ⁺ ,15 ⁺ ,50 ⁺		+++	-	+++
11		3	w/62 J	AK	Wange	8 ⁺	HPV5	+++	8	+++
12				Vv	Zeh	4 ⁺⁺ ,5 ⁺⁺ ,8 ⁺ ,20 ⁺		+++	-	+++
13				Vv	Finger	4 ⁽⁺⁾ ,5 ⁺⁺ ,12 ⁽⁺⁾ ,20 ⁺⁺		+++	-	+++
14				Vv	Finger	5 ⁺		+++	-	+++
15				BCC	Nase	5 ⁺⁺⁺		+++	-	+++
16				SCC	Knie	5 ⁺		+++	-	+++
17		4	w/54 J.	Vv	Hand	5 ⁺	HPV20	++	-	+++
18				normal	Arm	neg.		++	-	+++
19				Vv	Finger	12 ⁺ ,20 ⁺ ,23 ⁽⁺⁾ ,25 ⁺⁺		++	-	++
20				Vv	Stamm	9 ⁺ ,12 ⁺ ,20 ⁺ ,25 ⁺		+++	-	+++
21				normal	Finger	neg.		+++	-	+++
22				SCC	Finger	neg.		+++	-	+++
23		5	m/56 J	normal	Arm	neg.	n. n.	+++	n. n.	++
24				Vv	Finger	neg.		+++		++
25				SCC	Hand	neg		++		+++
26		6	w/ 60 J.	normal	Rücken	15 ⁺	HPV15	+++	-	++
27				Vv	Brust	12 ⁺ ,15 ⁺ ,23 ⁽⁺⁾ ,20 ⁺		+++	-	++
28				Vv	Bein	12 ⁺ ,15 ⁺ ,20 ⁽⁺⁾ ,21 ⁺ ,65 ⁺⁺		+++	-	+++
29				SCC	Unterschenkel	15 ⁺ ,23 ⁽⁺⁾ ,65 ⁺		+++	-	+++
30				SCC	Hand	12 ⁺ , 20 ⁺		+++	-	n.d.
31				AK	Finger	12 ⁺ , 15 ⁺ ,20 ⁺ ,23 ⁺ ,65 ⁺		+++	15	n.d.

AK, Aktinische Keratose; BCC, Basaliom; Bez, zusätzliche Bezeichnung; G., Geschlecht; HPV, humaner Papillomavirus; J., Jahr; m, männlich; NMSC, *non-melanoma skin cancer*; Nr., Nummer; Pat., Patient; SCC, *squamous cell carcinoma*; TX, Transplantation; w, weiblich; Vv, Warze; n.n., nicht nachweisbar.

Patient #1 hatte konsistente HPV9-Infektionen in beiden normalen Haut-Proben. In der AK des Patienten konnte die Mehrfachinfektion mit HPV9, 15, 20 und 23 gezeigt werden. Die SCC-Probe des Patienten zeigte eine Doppelinfektion mit HPV9 und HPV24. Patient #2 hatte konsistente HPV8 Infektionen in allen analysierten Haut-Proben. In 5 von 7 Proben des Patienten konnte eine HPV-Mehrfachinfektion gezeigt werden. Patient #3 hatte in 4 von 6 Proben eine Einfachinfektion mit HPV5. Zwei Warzenproben enthielten neben HPV5 drei weitere HPV-Typen. Auch Patient #4 zeigt nur in den zwei untersuchten Warzenproben eine

Mehrfachinfektion, dagegen konnte in allen anderen Proben des gleichen Patienten keine HPV-Typen nachgewiesen werden. Alle analysierten Proben von Patient #5 waren HPV negativ. Bei Patient #6 war in fünf von sechs Proben, sowohl im Plattenepithelkarzinom als auch in normaler Haut, HPV15 feststellbar. In 4 von 6 Proben (66%) hatte dieser Patient Mehrfachinfektionen.

Der Anteil HPV-infizierter Biopsien gegenüber nicht-HPV-infizierten Biopsien ist in Proben aus SCC-Gewebe um den Faktor 1,7 signifikant höher, als in normaler Haut. Die höchste Quote für HPV-Infektionen fand sich in Warzen und AK mit einem Mittelwert von 2,8 bzw. 3,0.

4.4.2 Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von HPV

Alle 28 Proben, in denen mittels Reverse Line Blot eine HPV-Infektion nachgewiesen werden konnte, wurden mittels qPCR auf transkriptionelle Aktivität der jeweiligen HPV durch deren E6/E7-Transkript-Expression untersucht. Es wurden in einem SCC und drei AK von insgesamt drei Patienten E6/E7-Transkripte von HPV8, 9 und 15 bestimmt. In einer AK wurde die aktive Transkription von 2 verschiedenen HPV-Typen, HPV9 und 15, über E6/E7-RNA nachgewiesen (s. Tabelle 9). Alle übrigen Proben zeigten zum Untersuchungszeitpunkt keine HPV-Aktivität.

Exemplarisch gezeigt wird die im Patienten #2 nachgewiesene Expression von HPV8-E6 mRNA in einer AK mittels qPCR (s. Abbildung 23A). Die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese zeigte nur in Probe #11 eine spezifische HPV-E6/E7-Expression (s. Abbildung 23B).

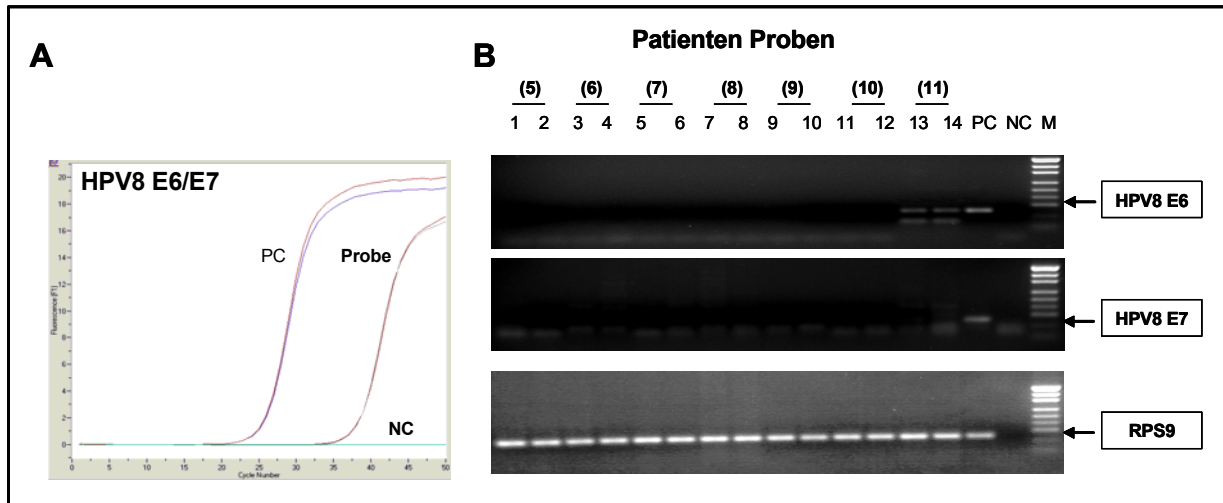


Abbildung 23: Transkriptionelle Aktivität von HPV8 E6/E7. Quantitative qPCR (A) und gelelektrophoretische Auftrennung der E6/E7-PCR-Produkte mit einem 2%igem Agarosegel (B). PC: Positivkontrolle; NC: Negativkontrolle; M: DNA-Marker. 1-14, Anzahl der untersuchten Proben; (1)-(11), Probenbezeichnung s. Tabelle 9.

Die nachgewiesene HPV8 E6/E7-mRNA wies die identische Sequenz wie der HPV E6/E7 Prototyp auf (Acc.nr. M12737.1; s. Abbildung 24)

HPV8 E6 (ORF, # 196-663)

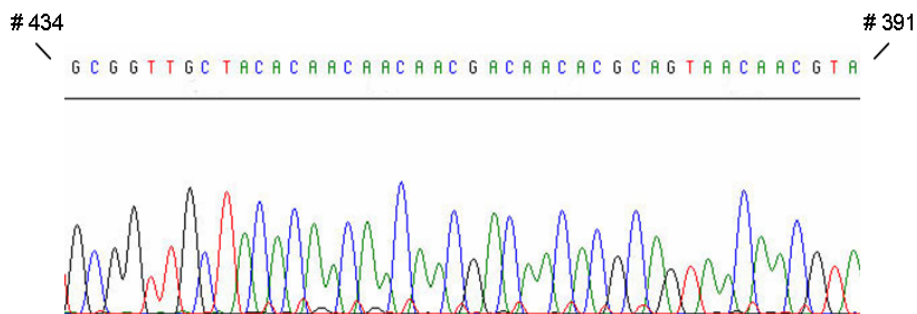


Abbildung 24: Ausschnitt eines Chromatogramms nach Sequenzierung des HPV8 E6/E7 PCR-Produktes. E6/E7 PCR-Produktes von Pat #2 und wurde mit dem Prototyp mit der Acc.no. M12737.1 verglichen.

4.4.3 Variantenanalyse der nachgewiesenen HPV E6/E7-Gene

Nachdem in der Mehrzahl der Biopsien HPV-DNA entdeckt und in 4 Proben eine HPV E6/E7-Expression nachgewiesen wurde, erfolgte die Sequenzierung der HPV E6-Gene in NMSC (s. Tabelle 9). Bei den sequenzierten PCR-Produkten von HPV9 und HPV15 des Patienten #1 zeigten sich Varianten der bekannten Prototypen (s. Abbildung 25, 26).

Nukleotidsequenz					Proteinsequenz				
	
	90	100	200	210		30	40	70	
HPV9E6 Pro	aatagattt	g ttgataccctt	tgtatggact	ctgtagtagc	HPV9E6 Pro	DTLVIPLIDL	LVPCKFCNRF	EDLVYGLCSS	
HPV9E6 1N	AATAGATTG	TTGGTACCTT	TGTATGGACT	CTGTAGTAGT	HPV9E6 1N	DTLVIPLIDL	LVPCKFCNRF	EDLVYGLCSS	
HPV9E6 1T	AATAGATTG	TTGGTACCTT	TGTATGGACT	CTGTAGTAGT	HPV9E6 1T	DTLVIPLIDL	LVPCKFCNRF	EDLVYGLCSS	
HPV9E6 3N	AATAGATTG	TTGGTACCTT	TGTATGGACT	CTGTAGTAGT	HPV9E6 3N	DTLVIPLIDL	LVPCKFCNRF	EDLVYGLCSS	
HPV9E6 3T	AATAGATTG	TTGGTACCTT	TGTATGGACT	CTGTAGTAGT	HPV9E6 3T	DTLVIPLIDL	LVPCKFCNRF	EDLVYGLCSS	
		L→S I→V		S→S					
	
	250	260	270	410		80	90	140	
HPV9E6 Pro	acacattttt	ttcaatttgc	tgtagtggga	gaaacagctg	HPV9E6 Pro	CAYASAQLEF	THFFQFAVVG	YKVRNSWKGL	
HPV9E6 1N	AAACATTTT	TTCAATTTC	TGCAGTCGGA	GAAACAACCTG	HPV9E6 1N	CAYASAQLEF	KHFFQFAVVG	YKVRNNWKGL	
HPV9E6 1T	AAACATTTT	TTCAATTTC	TGTAGTCGGA	GAAACAACCTG	HPV9E6 1T	CAYASAQLEF	KHFFQFAVVG	YKVRNNWKGL	
HPV9E6 3N	AAACATTTT	TTCAATTTC	TGTAGTCGGA	GAAACAACCTG	HPV9E6 3N	CAYASAQLEF	KHFFQFAVVG	YKVRNNWKGL	
HPV9E6 3T	AAACATTTT	TTCAATTTC	TGTAGTCGGA	GAAACAACCTG	HPV9E6 3T	CAYASAQLEF	KHFFQFAVVG	YKVRNNWKGL	
		T→K	V→A V→V	S→N					

Abbildung 25: Variantenanalyse des nachgewiesenen HPV9 E6-Gens. Nukleotidsequenzvergleich der einzelnen Proben 1N, 1T, 3N und 3T mit dem Prototyp. Grün: Nukleotid des Wildtyps; Blau: Nukleotidaustausch ohne Aminosäurenaustausch; Rot: Nukleotidaustausch mit Aminosäurenaustausch.

In 2 Proben normaler Haut (1N, 3N), einer AK (1T) und einer SCC (3T) wurden mehrere Sequenzveränderungen im HPV9 E6-Gen nachgewiesen. Bei allen Mutationen handelte es sich um den Austausch einzelner Nukleotide. In allen Proben lagen 3 Mutationen mit resultierendem Aminosäurenaustausch vor. Die drei veränderten Basen beinhalteten je einen Austausch an Position nt#94 von A → G, an nt#242 von C → A und an nt#407 von G → A. Ausserdem fanden sich 2 Mutationen an nt#210 und nt#267, die keinen Aminosäurenaustausch bewirkten.

Zusätzlich besaß Probe 1N eine Punktmutation an Position nt#263 von T → C mit einem Aminosäurenaustausch (V88A) und Probe 3T eine Punktmutation an nt#89 von T → C mit einem Aminosäurenaustausch (L30S).

Zusammenfassend lassen sich alle ermittelten Punktmutationen des HPV9 E6-Gen für den Patienten #1 wie folgt darstellen:

Bezeichnung	Mutation
Variante 1N	HPV9E6, 94G (I32V), 210T*, 242A (T81K), 263C (V88A) , 267C*, 407A (S136N)
Variante 1T	HPV9E6, 94G (I32V), 210T*, 242A (T81K), 267C*, 407A (S136N)
Variante 3N	HPV9E6, 94G (I32V), 210T*, 242A (T81K), 267C*, 407A (S136N)
Variante 3T	HPV9E6, 89C (L30S) , 94G (I32V), 210T*, 242A (T81K), 267C*, 407A (S136N)

* Mutation ohne Aminosäureaustausch

In der Probe 1T von Patient #1 wurde HPV15 E6 nachgewiesen. Die Sequenzierung des Gens zeigte 2 Punktmutationen mit Nukleotid- und Aminosäurenaustausch. An Position nt#126 wurde G → T mit Aminosäureaustausch (L42F) und an Position nt#127 A → G mit Aminosäureaustausch (N43D) (s. Abbildung 26).

	40 50
HPV15E6 Pro	QRFLTYIELV S F DRKGLQLI
HPV15E6 1T	QRFLTYIELV S L N RKGLQLI
Variante 1T: HPV15E6, 126T (L42F), 127G (N43D)	

Abbildung 26: Aminosäuresequenzvergleich der Probe 1T mit dem Prototyp (Pro). Zwei Punktmutationen an Position 126 von T mit Aminosäurenaustausch (L42F) und an Position 127 von G mit Aminosäurenaustausch (N43D). Grün: Nukleotid des Wildtyps; Rot: Nukleotidaustausch mit Aminosäurenaustausch.

5 DISKUSSION

5.1 DIFFERENZIELL REGULIERTE GENE IN SCC

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Expressionsprofil von 22.283 Genen in SCC mittels cDNA-Microarray-Technologie erstellt und mit dem der normalen Haut verglichen. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass ein Unterschied in 299 bzw. 118 (nach Ausschluss der ESTs) Genen die SCC-Gewebe und normale Haut charakterisieren. Auszüge dieser Daten wurden publiziert (Nindl *et al.*, 2006).

Diese Anzahl differenziell regulierter Gene ist relativ gering, verglichen mit Studien zu Darm- oder Brustkrebs, in denen 548-700 differenziell exprimierte Gene gefunden wurden (Alon *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997). Möglicherweise lag die Ursache dafür in der Biologie des SCC. Ein anderer Grund könnte eine geringere Sensitivität des cDNA-Microarrays gewesen sein, so dass insbesondere niedrig exprimierte Gene nicht identifiziert wurden. Durch eine weitere Methode der qPCR wurden die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse jedoch verifiziert. Der hohe Prozentsatz (>85%) der Gene, deren differenzielle Expression im cDNA-Microarray mittels qPCR bestätigt werden konnte, weist auf die Validität und Spezifität der durch die Transkriptomanalyse gewonnenen Daten hin.

Bislang wurden nur in einer einzigen Genexpressionsstudie humane NMSC-Biopsien (SCC n=3), normale Haut (n=1) und Hauttumor-Zelllinien (SCC1 und SCC2) mittels cDNA-Microarray untersucht (Dooley *et al.*, 2003). Es konnten jedoch nur 5 von 7.400 untersuchten Genen (0,7‰) identifiziert werden, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine unterschiedliche Expression aufweisen. Auch in der vorliegenden Studie, in der über 22.000 Gene aus 20 unabhängigen Proben von 5 organtransplantierten Patienten und 5 immunkompetenten Kontrollen untersucht wurden, zeigte eines dieser 5 Gene, *annexin 1*, eine erhöhte Expression in AK und SCC (change fold 1,7) und bestätigt die Daten der Expressionsstudie von Dooley *et al.* (2003). Die restlichen 4 Gene (Fibronectin 1, Glyceraldehyde-3-phosphat-dehydrogenase, Zinkfinger-protein 254 und das Huntington-associated-protein-interacting-protein (HAIP) der Studie von Dooley *et al.* (2003) waren in den Proben dieser Arbeit nicht differenziell exprimiert. Ausserdem wurden in dieser Studie Zelllinien verwendet, die *in vitro* nicht mit SCC-Zellen *ex vivo* vergleichbar sind (Alon *et al.*, 1999; Ismail *et al.*, 2000). Durch die Korrelation der Genanalyse der SCC-Zelllinien mit SCC-Gewebe schufen sie in ihrer Untersuchung einen

Datenfilter, der nicht den physiologischen Verhältnissen entsprach und damit möglicherweise bedeutende Gene herausfilterte.

Durch die Verwendung der nativen Biopsie *in toto* lag eine Mischung unterschiedlicher Zellarten in den Proben vor, insbesondere in den AK-Proben, da das entartete Gewebe von gesundem Gewebe unscharf abgegrenzt war. Ein deutlich höherer Anteil an NMSC-Zellen fand sich in den Proben der SCC-Biopsien, die die Gesamtheit des Gewebes darstellten. Somit ist es denkbar, dass die Expressionsunterschiede der identifizierten Markergene zwischen AK und SCC nicht nur in der unterschiedlichen Progression, sondern auch in dem unterschiedlichen Anteil maligner Zellen in der Biopsie zu suchen sind. Mikrodissektion von AK und SCC würden präzisere Analyse ermöglichen. Jedoch wäre durch die geringe mRNA-Menge eine Amplifikation der mRNA notwendig, die eine Transkriptverschiebung von 3' nach 5' bei der cDNA-Synthese und damit ein verändertes Genexpressionsprofil bewirken kann. Der Vorteil der Verwendung von nativen Biopsien *in toto* gegenüber der Mikrodissektion war die schnelle mRNA-Isolierung aus dem Gewebe. Somit konnten Artefakte durch die Probenprozessierung minimiert werden.

Durch Genexpressionsanalyse wurden 118 Gene identifiziert, die die SCC-Erkrankung von normaler Haut unterscheiden und somit für SCC charakteristisch sind.

5.2 CHARAKTERISIERUNG VON SCC-ASSOZIIERTEN GENEN

5.2.1 Hochregulierte Gene in SCC

Mittels PAM-Analyse wurden 42 hochregulierte Gene in SCC identifiziert. Von diesen Genen waren 19 (45%) in die Adhäsion involviert, 13 (31%) in die Zellkommunikation, sechs (14%) in den Stoffwechsel und jeweils eins (2%) in die Apoptose und die Proliferation. Im Folgenden werden mögliche Ursachen für die Hochregulierung der untersuchten Gene diskutiert. Die Expression der folgenden Gene konnte mittels qPCR bestätigt werden.

MAP4K4 gehört zur Familie der Serin/Threonin Proteinkinasen und aktiviert die MAPK8/c-Jun N-terminale Kinase (JNK) (Machida *et al.*, 2004). Der JNK-Signaltransduktionsweg ist an der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Osteoblasten beteiligt und wird mit der Transformation und Progression von Osteosarkomen in Verbindung gebracht (Papachristou *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine deutliche Hochregulation von *MAP4K4* in SCC-Proben (5,07-fach, qPCR und 2,65-fach, Microarray) gezeigt. Die Überexpression von *MAP4K4* in SCC ist eine Voraussetzung für die Verstärkung im JNK-Signaltransduktionsweg. Daher ist eine ähnliche biologische Konsequenz wie in Osteosarkomen in SCC möglich.

IL-1RN gehört zur Interleukin-1 Zytokinfamilie, hemmt die Aktivität von IL-1 α und IL-1 β und moduliert somit die Interleukin-1-vermittelte Immunantwort (Witkin *et al.*, 2002). Der homozygote Genotyp *IL-1RN*2/2* des *IL-1RN* Gens wird gehäuft bei Magenkrebs beobachtet, wobei der exakte Mechanismus bislang nicht vollständig untersucht/rekonstruiert ist (Glas *et al.*, 2004). In dieser Arbeit konnte eine Hochregulation von *IL-1RN* in SCC-Proben (3,52-fach, qPCR und 1,75-fach, Microarray) gezeigt werden. Die biologische Funktion von IL-1 β in der Tumورprogression ist nicht vollständig bekannt. Apte *et al.* (2006) charakterisierten die Funktion von IL-1 β , das von Tumorzellen gebildet wird, als Verstärkung der Tumordinvasion und diskutierten den Einsatz von IL-1 β -Antagonisten als innovative Therapie zur Vermeidung von Metastasierungen. Andererseits könnte die Antagonisierung von IL-1 β durch *IL-1RN* das Überleben von SCC-Zellen fördern, indem inflammatorische Effektorzellen nicht generiert bzw. aktiviert werden. IL-1 β wurde kürzlich als Schlüsselzytokin für die Differenzierung von Th-17 Zellen identifiziert (Acosta-Rodriguez *et*

al., 2007), die als potente Effektorzellen für die Auslösung inflammatorischer Reaktionen bekannt sind (Tato and O'Shea, 2006).

Der **IL-4 Rezeptor** (IL4R) ist in zahlreichen malignen Geweben überexprimiert, wie dem Melanom, Brust- und Eierstockkrebszellen (Obiri *et al.*, 1994). Auch in dieser Arbeit war *IL4R* (4,12-fach, qPCR und 2,41-fach, Microarray) in SCC-Proben hochreguliert. Zwar ist die biologische Funktion des IL4R bei entarteten Zellen bislang nicht geklärt, doch können die Zellen durch dessen Expression Ziel therapeutisch eingesetzter Zytotoxika werden (Shimamura *et al.*, 2006). Ein Fusionsprotein eines mutierten *Pseudomonas* Exotoxins mit IL-4, IL-4-PE38QQR, zeigte *in vitro* und *in vivo* eine Hemmung des Zellwachstums (Shimamura *et al.*, 2006). Gegenwärtig wird die Substanz in Phase-III-Studien an Glioblastompatienten getestet. Ob metastasierte SCC auch damit behandelt werden können, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

NMI interagiert mit den Onkogenen *C-myc*, *N-myc* und Transkriptionsfaktoren, die ein ZIP- und/oder HLH-Bindungsmotiv aufweisen (Bao and Zervos, 1996). Der Transkriptionskomplex, bestehend aus NMI, BRCA1 und c-Myc, führt zur Aktivierung der Telomerase (Li *et al.*, 2002). Die in dieser Arbeit ermittelte Überexpression von *NMI* in SCC (2,83-fach, qPCR und 2,33-fach, Microarray) könnte demnach in gesteigerter Telomeraseaktivität und damit in einer Verlängerung des Zellüberlebens resultieren. Somit wäre *NMI* ein Gen, das in der Tumorprogression von SCC eine wesentliche Rolle spielt. NMI interagiert mit Molekülen der STAT (Signal „transducer“ and „activator“ of T cells)-Familie, jedoch nicht mit STAT2, das in verstärkter Transkription von Interleukin-2 und Interferon- γ -aktivierten Genen resultiert (Zhu *et al.*, 1999). Zwar sind die IL-2 Rezeptoren (IL2RA, syn. CD25; IL2RB, syn. CD122) in SCC nicht exprimiert (Expression < 100), jedoch war der Interferon- γ -Rezeptor (CD119) hoch exprimiert (ca. Faktor 10.000; Sensitivitätsgrenze = 100). Insofern ist in SCC eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Signalen des Interferon- γ -Rezeptors, verglichen mit normaler Haut, durch differenzielle Expression denkbar. Inwieweit dies eine Rolle für die Entstehung und Erhaltung von SCC spielt, muss in gezielten weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Der Wachstumsfaktor Granulin **GRN** stimuliert die Progression und Metastasierung von Brustkrebs und ist an der Entstehung von Glioblastom, Eierstock- und Nierenkrebs beteiligt (Ong and Bateman, 2003). Auch in SCC findet sich *GRN* überexprimiert (3,00-fach, qPCR),

und es ist möglich, dass dessen Expression in der Entstehung und Erhaltung von SCC wie in den anderen Malignomen eine Rolle spielt.

E-Cadherin (**CDH1**) gehört zur Cadherin-Familie und ist ein Calciumabhängiges Zelladhäsionsmolekül. Es vermittelt den Kontakt von Zellen untereinander und die Adhäsion von Zellen an Bestandteile der extrazellulären Matrix. Mutationen im *CDH1*-Gen korrelieren mit einer Anzahl von Tumoren und resultieren im Verlust der Funktion des Gens, was möglicherweise zu maligner Progression und Metastasierung führt (Bryant and Stow, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine starke Hochregulation von *CDH1* in SCC-Proben (4,55-fach, qPCR) gezeigt. Die Überexpression von *CDH1* in SCC deutet auf eine Funktion als möglicher Invasionsmarker hin.

Matrix-Metalloproteinasen (**MMPs**) sind Enzyme, die Bestandteile des interstitiellen Bindegewebes und der Basalmembran abbauen können. Tsukifuji *et al.* (1999) zeigten in SCC (16 AK, 6 AK/SCC und 15 SCC), dass MMP-1, MMP-2 und MMP-3 an der Invasion dysplastischer Zellen beteiligt sind (Tsukifuji *et al.*, 1999). In HPV8-E7-transduzierten Keratinozyten führte eine MMP1-Expression *in vitro* zur Invasion von Keratinozyten durch die Dermis (Akgül *et al.*, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit fand sich eine starke Überexpression von MMP-1 (58,4-fach in SCC und 10,2-fach in AK, qPCR) und auch MMP-9 (4,7-fach, Microarray) in SCC-Proben. Diese sehr hohen Induktionswerte kommen dadurch zustande, dass in normaler Haut MMP-1 mRNA gering basal exprimiert und in SCC deutlich überexprimiert vorliegt. Ob MMP-1 ein Markergen für die Tumorprogression ist, weil es in SCC stärker induziert wird als im *carcinoma in situ* AK, oder ob der Unterschied im Anteil von SCC-Zellen in der Biopsie begründet ist, ist anhand der vorliegenden Daten nicht zu bestimmen. Untersuchungen mit aufgereinigten SCC-Zellen aus AK und SCC könnten diese Frage beantworten.

RAB31 gehört zur *RAS*-Protoonkogenfamilie, die im Wesentlichen aus drei Protoonkogenen (*Ha-ras*, *Ki-ras*, *N-ras*) besteht. Diese kodieren für GTPasen, die an der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren beteiligt sind. Durch bestimmte Punktmutationen im *ras*-Gen kommt es zur Dysregulation des Zellwachstums (Russell and Hoeffler, 1996), dies kann anschliessend zur Tumorentstehung führen (Macaluso *et al.*, 2002). *RAB31* ist in SCC-Proben dieser Arbeit deutlich überexprimiert und detaillierte Untersuchungen, in denen AK von SCC getrennt untersucht wurden, zeigen, dass dieses Protoonkogen analog zur Progression

überexprimiert wird. Dies deutet darauf hin, dass der GTP-Stoffwechsel in der Tumorgenese eine entscheidende Rolle spielt.

5.2.2 Herunterregulierte Gene in SCC

Die PAM-Analyse identifizierte 76 in SCC herunterregulierte Gene. Von diesen Genen sind 27 Gene (36%) am Stoffwechsel beteiligt, 18 (24%) an der Proliferation, 6 (8%) jeweils an der Differenzierung, an der Apoptose und an der Detoxifikation, 5 Gene (7%) an der Adhäsion und drei (4%) an der Zellkommunikation. Die Funktion 5 weiterer Gene (7%) ist unbekannt. Im Folgenden werden mögliche Ursachen für die Herunterregulierung der untersuchten Gene diskutiert.

ERCC1 besitzt eine große Homologie zum Exzisionsreparaturprotein *RAD10* in Hefepilzen (van Duin *et al.*, 1986). ERCC1 bindet an weitere DNA-Reparaturproteine wie XPA und ERCC4 (Li *et al.*, 1994). Dieser Komplex erkennt die DNA-Schäden und leitet die Reparatur der beschädigten DNA ein (Park and Sancar, 1994). Der DNA-vermittelte Gentransfer von *ERCC1* in *Xeroderma pigmentosum*-Zellen des Hamsters zeigte eine fehlerhafte Einleitung der DNA-Reparatur (Rubin *et al.*, 1983). ERCC1 ist im Zusammenhang mit maligner Entartung und Onkogenese beschrieben worden (van Duin *et al.*, 1986). So ist dieses bei Hoden- und Eierstockkrebs supprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls eine Suppression von *ERCC1* in SCC-Proben (2,91-fach, qPCR) gezeigt werden. Die transkriptionelle Suppression dieses Gens könnte in SCC dazu beitragen, dass DNA-Schäden in Keratinozyten, die möglicherweise im Überleben der SCC-Zellen resultieren, nicht repariert werden und somit als Onkogen die Entstehung und Erhaltung von SCC fördern.

APR-3 wurde mittels einer Hybridisierungsmethode von Zhu *et al.* (2000) als ein an der Apoptose beteiligtes Gen identifiziert. Dieses Gen ist in verschiedenen Zellen ein durch All-trans Retinsäure induziertes Membranprotein und stoppt den Zellzyklus in der G1/S-Phase mit reduzierter Cyclin-D1-Expression (Yu *et al.*, 2007). In dieser Arbeit war *APR-3* in SCC-Proben (1,32-fach, qPCR) herunterreguliert. Die Herunterregulation dieses Gens in SCC könnte eine Verzögerung bzw. Verhinderung des programmierten Zelltodes bedeuten und so das Überleben von SCC-Zellen verlängern.

NKEFB gehört zur Peroxiredoxin Familie, die antioxidierende Enzyme zusammenfasst und spielt eine Rolle bei der Tumorgenese (Shau *et al.*, 1994). In dieser Arbeit war *NKEFB* in SCC-Proben (2,13-fach, qPCR) herunterreguliert. In SCC-Zellen ist die Herunterregulation möglicherweise Ursache dafür, dass sich freie Sauerstoffradikale akkumulieren und die so eine mutagene Schädigung des Genoms bewirken können (Shau *et al.*, 1994).

Weitere herunterregulierte Gene in SCC kodieren für Enzyme des Stoffwechsels der Mitochondrien (36%), wie *cytochrome c oxidase*, *cytochrome b* und *NADH dehydrogenase*. Die dadurch nahe liegende mitochondriale Dysfunktion deutet auf eine signifikante Funktion in der Karzinogenese von SCC hin. Auch in anderen Neoplasien, wie dem intraepithelialen Prostata-Karzinom, Lungen- oder Kehlkopfkrebs konnte eine hohe Mutationsrate einer mitochondrialen *NADH*-Untereinheit nachgewiesen werden (Jeronimo *et al.*, 2001). In Brustkrebszelllinien wurde der Verlust mitochondrialer Gene im Zusammenhang mit verstärktem oxidativem Stress (ROS, reactive oxygene species), Reduktion der DNA-Reparatur und genetischer Instabilität diskutiert (Delsite *et al.*, 2002). Dies kann zur Aktivierung von Onkogenen, Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Hemmung der Apoptose führen (Delsite *et al.*, 2002).

5.3 FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DER IDENTIFIZIERTEN GENE IN SCC

Zusammenfassend lassen sich die untersuchten Gene schematisch mit ihren Funktionen innerhalb der Zelle darstellen (s. Abbildung 27). Sie wurden in funktionelle Gruppen eingeteilt: in hoch- (rot markiert) und in herunter- (grün markiert) regulierte Gene.

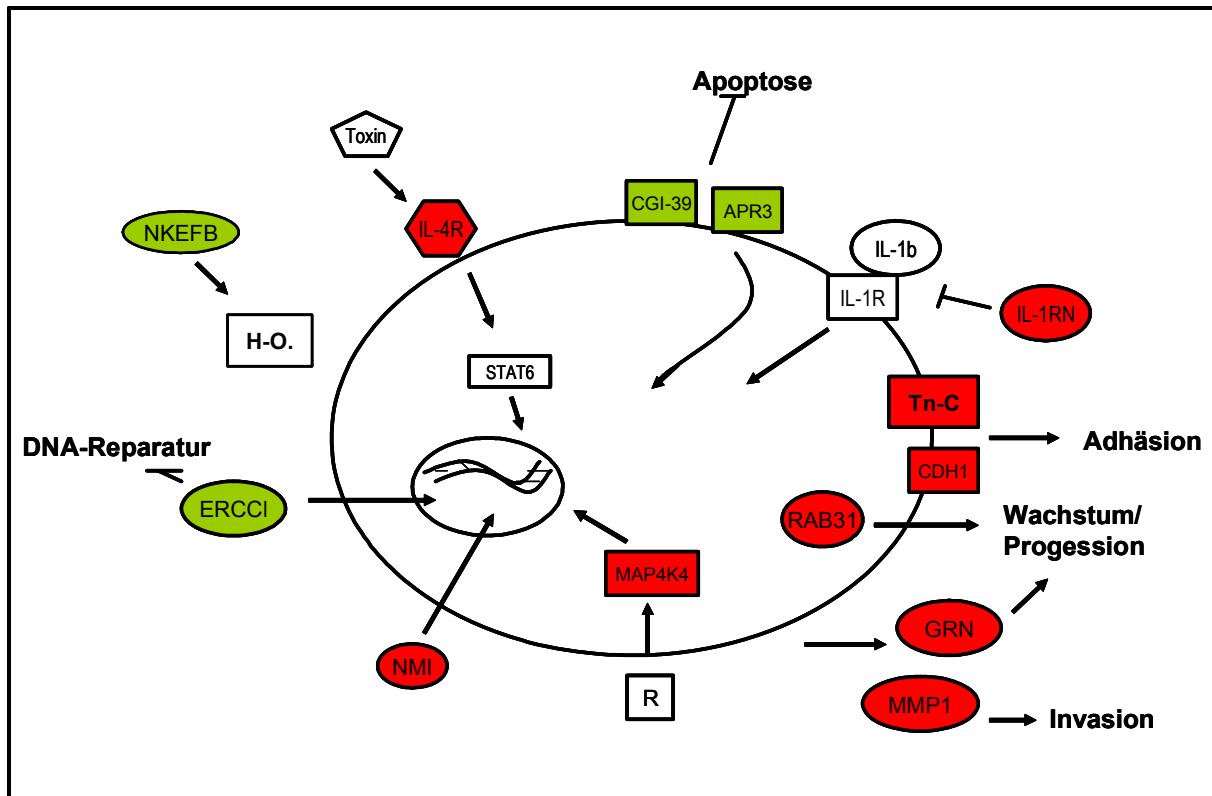


Abbildung 27: Schematische Darstellung der verifizierten, differenziell regulierten Gene einer repräsentativen SCC-Zelle. Dargestellt sind die gegenüber normaler Haut differenziell hochregulierten (rot) und die herunterregulierten Gene (grün) hervorgehoben und den jeweiligen subzellulären Strukturen zugeordnet (weiß=nicht differenziell regulierte, involvierte Moleküle; R=beliebiger Rezeptor, dessen Aktivierung wiederum MAP4K4 aktiviert; IL1R=Interleukin-1-Rezeptor).

Die Überexpression von Serin/Threonin Proteinkinase **MAP4K4** in SCC führt zu einer Verstärkung des JNK-Signaltransduktionsweges und könnte die Transformation und Progression in SCC fördern. Der **IL-4R** ist in zahlreichen malignen Geweben überexprimiert und fördert das Zellwachstum. **NMI** bindet BRCA1 und c-Myc als Transkriptionskomplex und führt zur Aktivierung der Telomerase (Li *et al.*, 2002). Die Überexpression von *NMI* in SCC

steigerte die Telomerase-Aktivität und verlängerte somit das Zellalter. **IL-1RN** hemmt die Aktivität von IL-1 α und IL-1 β und moduliert dadurch die Interleukin-1 vermittelte Immunantwort. Dadurch könnte die Antagonisierung von IL-1 β durch *IL-1RN* das Überleben von SCC-Zellen fördern, indem inflammatorische Effektorzellen nicht generiert bzw. aktiviert werden. Der Wachstumsfaktor Granulin **GRN** stimuliert die Progression und Metastasierung von Zellen, dessen Überexpression könnte mit der Entstehung und Erhaltung von SCC einhergehen. Die Überexpression des *RAS*-Protoonkogens **RAB31** könnte zur Dysregulation des Zellwachstums führen. **MMP-1** baut Bindegewebe und Teile der Basalmembran ab und ist somit an der Invasion dysplastischer Zellen beteiligt. **CDH1** ist ein Calcium-abhängiges Zelladhäsionsmolekül. Die Überexpression von *CDH1* in SCC deutet auf eine Funktion als möglicher Invasionsmarker hin.

ERCC1 ist an der DNA-Reparatur beteiligt, seine Suppression verhindert die Initiation der DNA-Reparatur und fördert somit Mutationen. Die geringe Expression von **NKEFB**, ein antioxidierendes Enzym, könnte zu einer Akkumulation freier Sauerstoffradikale und somit zu vermehrten Mutationen führen. **APR-3**, ein Apoptoseprotein, wurde in SCC ebenfalls herunterreguliert.

Ausgewählte Gene (9 hochregulierte und 4 herunterregulierte Gene) zeigen Funktionen für die Tumorenstehung oder Progression von SCC.

5.4 TN-C ALS SCC-FRÜHERKENNUNGSMARKER

5.4.1 Analyse der Expression von Tn-C in SCC

Tn-C ist ein Zelladhäsionsprotein, das durch seine Bindungsfähigkeit an Bestandteile der extrazellulären Matrix die Infiltration in Bindegewebe ermöglicht und in maligne Progressionen verschiedener Tumoren involviert ist (Adams *et al.*, 2002; Emoto *et al.*, 2001; Herold-Mende *et al.*, 2002; Koljonen *et al.*, 2005). Eine Assoziation von Tn-C konnte mit Malignomen der Brustdrüsen (Kalembeyi *et al.*, 2003), des Darms (Gazzaniga *et al.*, 2005), der Prostata (Katenkamp *et al.*, 2004) und der Schilddrüse (Tseleni-Balafouta *et al.*, 2006) gefunden werden.

In dieser Arbeit wurde erstmalig die mRNA-Expression von Tn-C in SCC relativ quantifiziert und auf Proteinebene in Biopsien bestätigt (Dang *et al.*, 2006a). Mittels qPCR konnte eine erhöhte Expression von Tn-C mRNA in dysplastischen Zellen im Vergleich zur normalen Haut gezeigt werden, dabei konnte eine Korrelation der Genexpression mit der Tumorprogression (in AK=3,5-fach; SCC= 20-fach) nachgewiesen werden. Diese Daten stehen im Einklang mit einer vorangegangenen Studie, die 4 AK- und 4 SCC-Proben auf *Tn-C* mRNA Expression mittels *in situ* Hybridisierung untersuchte (Tuominen and Kallioinen, 1994). Sie konnten in AK *Tn-C* mRNA nur in vereinzelt stromalen Zellen im *Stratum papillare* unter den SCC-Zellen nachweisen. In SCC-Geweben war Tn-C mRNA *in situ* in wesentlich mehr Zellen aktiv transkribiert. Neben *Tn-C* war in der vorliegenden Arbeit auch *MMP9* in SCC überexprimiert (s. Anhang). Beide Proteine wirken synergistisch bei der Degradation der Basalmembran, dies korreliert mit der Invasion von Tumorzellen bei Brustkrebs (Kalembeyi *et al.*, 2003) und Schilddrüsenkrebs (Tseleni-Balafouta *et al.*, 2006). Das legt die Vermutung nahe, dass die Überexpression von Tn-C bei der Invasion in SCC eine Rolle spielt.

Auf Proteinebene wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 66 Hautproben, davon 25 von normaler Haut, 19 AK- und 22 SCC-Proben mittels immunhistologischer Untersuchungen analysiert. In normaler Haut konnte Tn-C nur in vereinzelt Expressionsloci assoziiert mit vaskulären Endothelzellen, ekkrinen Schweißdrüsen und in Haarfollikeln beobachtet werden, was im Einklang mit anderen Studien steht (Koukoulis *et al.*, 1991; Lightner *et al.*, 1989; Shikata *et al.*, 1994). In AK-Proben war die Tn-C-Expression ausschließlich auf die Papillarschicht der Dermis begrenzt. In SCC war Tn-C-Expression darüber hinaus in der Geflechschicht und Epidermis exprimiert, mit Betonung auf Keratinozyten, die das SCC-

Gewebe umgeben, übereinstimmend mit den Ergebnissen vorangegangener Studien (Schalkwijk *et al.*, 1991). Im Prozess der posttraumatischen Wundheilung fand sich Tn-C in der oberen Dermis entlang der Basalmembran exprimiert (Latijnhouwers *et al.*, 1996; Mackie *et al.*, 1988). Die intensive Färbung der SCC-Zellen der Invasionsfront deutet darauf hin, dass eine Korrelation mit dem Proliferationspotential von Basalzellen besteht (Katenkamp *et al.*, 2004). Ob die Tn-C-Expression als Reaktion auf tumorassoziierten Gewebestress oder kausal von SCC-Zellen in der Tumorprogression dominant ist, ließe sich z.B. durch siRNA-knockdown von Tn-C in SCC-Zellen *in vitro* oder durch stabile Überexpression von Keratinozyten auf einer Basalmembran mit Tn-C genauer beschreiben.

Sowohl die Induktion von Tn-C mRNA in SCC als auch die Lokalisation im Gewebe deutet darauf hin, dass Tn-C in der Ausbreitung von SCC eine entscheidende Rolle spielt. Somit ist die funktionelle Blockade von Tn-C ein potentielles Ziel für die innovative Therapie von SCC.

Sowohl auf mRNA- als auf Proteinebene wird Tn-C in AK und SCC verstärkt exprimiert und deutet auf eine mögliche Beteiligung an der Invasion von SCC-Zellen hin.

5.4.2 Expression von Tn-C Spleißvarianten in SCC

Im Rahmen dieser Arbeit waren kleine Spleißvarianten der Tn-C mRNA bzw. Proteinisoformen nur in normaler Haut messbar. Spezifische und größere Spleißvarianten konnten nur in SCC gefunden werden. Dies bestätigt die Beobachtungen in anderen entarteten Geweben unterschiedlicher Entitäten wie Brustkrebs (Borsi *et al.*, 1992; Tsunoda *et al.*, 2003) und Schilddrüsenkrebs (Tseleni-Balafouta *et al.*, 2006). Zwar ist die Funktion der veränderten Proteinisoformen nicht geklärt, das Vorhandensein veränderter Tn-C Spleißvarianten korreliert jedoch mit Invasion und Aggressivität des jeweiligen Malignoms (Tsunoda *et al.*, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit war das kleine Tn-C PCR-Produkt mit der Größe von 332 bp nachweisbar und beinhaltet nur die Spleißregion TNCfn5-6 ohne Exon 10-16 und AD2/1-Region. Dieses Produkt fand sich in allen untersuchten Proben und ist somit nicht spezifisch für Tumorgewebe. Im Gegensatz dazu war in den SCC-Proben dieser Arbeit die große, 2243 bp lange *Tn-C* Spleißvariante, die alle Exons ausser der AD2/1-Region beinhaltet, spezifisch in malignem NMSC-Gewebe nachweisbar. Dieses Transkript wird im Zusammenhang mit Tumorinvasion und Rekrutierung von Tumorwachstum begünstigendem Stroma diskutiert

(Hindermann *et al.*, 1999; Katenkamp *et al.*, 2004). Da die hier untersuchten Proben diese Thesen bestätigen, ist denkbar, dass auch in SCC die Tn-C-Isoform 2243 bp die Invasions- und Überlebenskapazität des SCC begünstigt hat. Somit würde sich diese Spleißvariante als diagnostischer Marker für SCC eignen.

Spezifische Spleißvarianten von Tn-C werden nur in SCC, nicht in Normalhaut nachgewiesen und eignen sich als potentielle Marker für AK oder SCC.

5.5 UNTERSUCHUNGEN VON HPV TRANSKRIPTEN IN SCC

5.5.1 HPV-Infektion in SCC

Für einen kausalen Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und der Entstehung von SCC sind spezifische Kriterien Grundvoraussetzung, zu denen die Infektion mit HPV, die Aktivität von HPV und deren transformierende Kapazität zählen (Nindl *et al.*, 2007). Derzeit ist nicht vollständig geklärt, ob eine Infektion mit HPV die Entstehung von SCC begünstigt oder ob die Infektion als Begleiterscheinung auftritt.

Epidemiologische Daten deuten auf eine Funktion von HPV in der Entstehung von SCC hin. Es werden eine Vielzahl von kutanen HPV-Typen, insbesondere der Gattungen β/γ in SCC und Normalhaut gefunden (Brink *et al.*, 2005; Forslund *et al.*, 1999; Harwood *et al.*, 1999). Die Anzahl unterschiedlicher β/γ -assoziierter HPV-Typen ist in SCC höher (90%) als in normaler Haut (11-32%) (Berkhout *et al.*, 2000; de Jong-Tieben *et al.*, 2000; Harwood *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2001; Shamanin *et al.*, 1994), wobei die Viruskopienanzahl mit fortschreitender Progression abnimmt (Dang *et al.*, 2006b; Weissenborn *et al.*, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in 57% der gesunden Hautproben, 92% der benignen Warzen und in 83% der SCC immunsupprimierter Patienten die DNA von 14 verschiedenen kutanen HPV-Typen nachgewiesen (Dang *et al.*, 2006b). Die Daten dieser Arbeit sind vergleichbar mit vorangegangenen Untersuchungen, die in 90% der SCC immunsupprimierter Patienten eine HPV-Infektion nachwiesen (Berkhout *et al.*, 2000; Forslund *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2001). Diese Prävalenz ist bei immunsupprimierten Patienten im Vergleich zu Immunkompetenten, bei denen nur 30% der SCC mit HPV infiziert sind, erhöht (Berkhout *et al.*, 2000; Forslund *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2001).

Ferner sind in SCC bei Immunsupprimierten, verglichen mit Immunkompetenten, häufiger HPV-Mischinfektionen nachweisbar (Harwood *et al.*, 2000; Pfister *et al.*, 2003). In 66% der Proben dieser Arbeit waren Mischinfektionen mit unterschiedlichen HPV-Typen nachweisbar. Diese Genexpressionsanalyse in SCC identifizierte einen Antagonisten des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β in SCC als überexprimiert. Es ist denkbar, dass dadurch die IL-1 β -vermittelte Migration und Aktivierung von Makrophagen und Monozyten in SCC reduziert ist und so die Infektion und Persistenz von unterschiedlichen HPV-Typen begünstigt wird.

Die Daten dieser Arbeit identifizierten keinen spezifischen kutanen HPV-Typ als dominant in SCC. Es wurden zwar konsistente Infektionen in 4 von 6 Patienten nachgewiesen, jedoch mit 4 verschiedenen HPV-Typen 5, 8, 9 und 15. Zwar lässt die Stichprobe von 6 Patienten nur eine limitierte Aussage über die Dominanz spezifischer HPV-Typen in SCC zu, doch stehen die Daten in Einklang mit umfangreichen epidemiologischen Studien, in denen die Seroreaktivität HPV-spezifischer Antikörper mit dem Auftreten von SCC in immunsupprimierten und immunkompetenten Individuen korrelierten (Feltkamp *et al.*, 2003; Karagas *et al.*, 2006). Diese zeigten für die meisten der getesteten HPV-Typen nur schwache Korrelationen der HPV-spezifischen Antikörper mit dem Auftreten von SCC, abgesehen von HPV5, für den auch in einem Patienten der vorliegenden Studie eine konsistente Infektion nachgewiesen werden konnte. Über ein transformierendes Potential von HPV5 für die Entwicklung von SCC in Immunsupprimierten liegen derzeit keine sicheren Daten vor, jedoch deutet die Assoziation von HPV5 mit malignen Hauttumoren bei EV-Patienten darauf hin (Orth, 2006).

Mittels BGC-PCR/RLB-System, einer sensitiven und effizienten Nachweismethode für 24 kutane HPV-Typen, werden sowohl in SCC-Proben als auch in Normalhaut- und Warzen-Proben spezifische HPV-Typen nachgewiesen.

5.5.2 HPV E6/E7-Aktivität in SCC

Die Aktivität von HPV im Tumorgewebe ist neben der Infektion mit HPV und dessen transformierender Kapazität Grundvoraussetzung für einen kausalen Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und der Entstehung von SCC (Nindl *et al.*, 2007). Durch die Kenntnis der HPV-Infektion in den Proben konnte die transkriptionelle HPV-Aktivität mittels molekularbiologischer Nachweise der spezifischen HPV E6/E7-Transkripte von HPV8, 9 und 15 in AK und in SCC immunsupprimierter Patienten bestimmt werden, jedoch nicht in benignen Hautveränderungen (Dang *et al.*, 2006b).

In 40% der in dieser Arbeit untersuchten SCC wurde die HPV-Aktivität anhand der Expression spezifischer E6/E7-Transkripte nachgewiesen. Diese deutlich höhere Frequenz als in der einzigen bislang vorliegenden Studie (5,9%) (Purdie *et al.*, 2005) kann in der höheren Sensitivität der qPCR begründet liegen oder aber in der Patientenauswahl, da in dieser Untersuchung ausschließlich Proben immunsupprimierter Patienten untersucht wurden.

Man nimmt an, dass HPV E6-Proteine über verschiedene, voneinander unabhängige Mechanismen die Entstehung von SCC begünstigen können. Dazu zählen die Verhinderung der Apoptose und mutagene Eigenschaften. Durch Degradation des pro-apoptotischen Proteins BAK können kutane HPV E6-Proteine, unter anderem für HPV5 nachgewiesen anti-apoptotisch wirken (Jackson *et al.*, 2000). Ausserdem resultiert die Bindung vom HPV8-E6 Protein an XRCC1, einem Reparaturprotein der DNA zur Korrektur von Einzelstrangbrüchen, in funktioneller Hemmung (Iftner *et al.*, 2002). Dadurch ist es möglich, dass über Destabilisierung der DNA die Tumorentstehung von SCC begünstigt wird. Für das HPV8-E7 Protein konnte die Invasion in die Dermis *in vitro* mittels organotypischem Hautmodell gezeigt werden (Akgül *et al.*, 2005). Somit könnten von HPV8 die zwei unterschiedlichen E-Proteine E6 und E7 die Tumorprogression von SCC begünstigen.

Eine Evidenz für kanzerogene Eigenschaften des HPV8 wird durch gezielte Genveränderung im Mausmodell gegeben. In einer transgenen Maus, in der alle HPV8-E-Proteine unter Kontrolle des Keratin-14-Promoters in Keratinozyten exprimiert werden, entwickeln 91% der Tiere spontan papillomatöse, SSC-ähnliche Hauttumoren (Schaper *et al.*, 2005). In einer weiteren Studie wurden im Tumorgewebe einer HPV8-transgenen Maus unter anderem die beiden Proteine MMP9 und MMP13 verstärkt exprimiert, wobei der genaue Mechanismus der MMP-Induktion nicht aufgeklärt ist (Akgül *et al.*, 2006). MMP9 ist auch in den analysierten Proben dieser Arbeit in SCC gegenüber normaler Haut höher exprimiert (s. Anhang). Auch wenn der direkte kausale Zusammenhang zwischen virus-assoziiert induktion von Metalloproteinasen und Kanzerogenese ungeklärt ist, so deuten die Daten dieser Studie auf eine mögliche Funktion in der Tumorgenese, bzw. Progression hin. Durch Kreuzung der HPV8-transgenen Mäuse mit MMP9-, bzw. MMP13-knockout Mäusen, könnte diese Frage beantwortet werden. Alternativ könnten spezifische Inhibitoren von MMP9, bzw. MMP13 im HPV8-transgenen Mausmodell angewandt werden.

In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Expression HPV-spezifischer früher E-Proteingene eine Veränderung des Keratinmusters sowie eine Reduktion der anti-proliferativen Proteine p21 und pRB der Haut *in vitro* erzeugen können (Akgül *et al.*, 2007). Dies trägt möglicherweise dazu bei, dass maligne transformierte Zellen verstärkt proliferieren. Andererseits könnten die infizierten Keratinozyten *in vivo* durch das veränderte Keratinmuster für das Immunsystem schlechter erreichbar sein.

Über die Pathomechanismen der anderen identifizierten HPV-Typen 9 und 15, die in SCC Aktivität zeigten, sind derzeit keine funktionellen Daten vorhanden. Der Nachweis der E6/E7-

Proteintranskripte im Rahmen dieser Studie in SCC, jedoch nicht in normaler Haut deutet darauf hin, dass HPV9 und 15 in die Tumorgenese involviert sind.

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit eine sensitive und strukturierte Systematik in der Erfassung von HPV-Infektionen von Hautbiopsien, die die erstmalige Beschreibung der Aktivität von HPV8, 9 und 15 durch Nachweis der E6/E7-Transkription in diesen Proben ermöglicht hat. Die Korrelation des Verteilungsmusters dieser Transkripte mit dem Grad der Malignität der Hautbiopsien legt einen Zusammenhang von HPV-Infektion mit der Entartung des Gewebes nahe.

Die Aktivität von HPV8, 9 und 15 konnte nur in AK- und SCC-Proben, nicht aber in HPV-positiven Normalhaut- oder Warzen-Proben nachgewiesen werden. Dies weist auf eine Aktivierung des Virus während der Tumorgenese hin.

5.5.3 HPV-Infektion von SCC mit Varianten von HPV9 und 15

Im Rahmen der Untersuchung der Spezifität der identifizierten HPV E6/E7-Expression in SCC von HPV9 und 15 wurde deren Sequenz analysiert und Varianten des jeweiligen Prototyps festgestellt. Eine veränderte Proteinsequenz kann sowohl die Bindungseigenschaften innerhalb des Proteins beeinflussen, als auch die Interaktion mit anderen Zellstrukturen. Als eine mögliche Ursache für das Entstehen kutaner HPV-Varianten wird UV-Strahlung diskutiert (Deau *et al.*, 1991).

Derzeit sind noch keine genetischen Varianten von HPV9 und 15 beschrieben worden. Von anderen HPV-Typen sind Varianten häufig. So fanden sich Varianten von HPV5 in 3,6-11% der untersuchten Hautproben normaler Haut und SCC-Gewebe von Patienten mit EV (Deau *et al.*, 1993), auch wenn ein direkter Zusammenhang mit der Entstehung von SCC wenig wahrscheinlich ist, da die Variante auch in gesundem Gewebe nachweisbar war. In 6 von 19 Proben von Warzen nierentransplanterter Patienten wurden HPV2-, 3- und 4-Varianten festgestellt, deren Funktion jedoch nicht näher bestimmt wurde (Wilson *et al.*, 1989).

Eine funktionelle Relevanz von HPV-Varianten wurde *in vitro* für eine HPV16 E7-Variante mit einer Punktmutation und Aminosäurenaustausch (N53S), die zu einer Immunresistenz führte, nachgewiesen (Smahel *et al.*, 2007). Auch für eine HPV5 E6-Variante

wird ein Selektionsvorteil diskutiert, durch den Nachweis in SCC von 3 unabhängigen EV-Patienten (Deau *et al.*, 1993; Muscardin *et al.*, 2001; Yabe *et al.*, 1991).

Die in dieser Arbeit identifizierten Varianten des HPV9 E6-Gens zeigten an insgesamt 7 Nukleotidpositionen Punktmutationen, wobei 5 davon zu einem Aminosäureaustausch führten. Desweiteren resultierten 2 Punktmutationen im HPV15 E6-Gen im Aminosäureaustausch.

Es ist derzeit nicht sicher feststellbar, ob diese Punktmutationen funktionelle Auswirkungen haben. Ob die identifizierten kutanen HPV E6-Varianten einen direkten Einfluss auf die Hauttumorgenese haben, könnte in einem geeigneten *in vitro* organotypischem Modell („raft model“) funktionell untersucht werden, in dem primäre humane Keratinozyten auf einer Kollagenmatrix kultiviert werden, so dass eine Epidermis ähnliche Struktur entsteht und dann mit (mutierten) HPV E6/E7-Varianten infiziert werden.

In SCC sind HPV E6-Varianten nachgewiesen worden, die Punktmutationen aufwiesen. Diese könnten das onkogene Potential des HPV im Gewebe erhöhen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8, 942-949.
- Adams, M., Jones, J.L., Walker, R.A., Pringle, J.H., and Bell, S.C. (2002). Changes in tenascin-C isoform expression in invasive and preinvasive breast disease. *Cancer Res* 62, 3289-3297.
- Akgül, B., Garcia-Escudero, R., Ghali, L., Pfister, H.J., Fuchs, P.G., Navsaria, H., and Storey, A. (2005). The E7 protein of cutaneous human papillomavirus type 8 causes invasion of human keratinocytes into the dermis in organotypic cultures of skin. *Cancer Res* 65, 2216-2223.
- Akgül, B., Ghali, L., Davies, D., Pfister, H., Leigh, I.M., and Storey, A. (2007). HPV8 early genes modulate differentiation and cell cycle of primary human adult keratinocytes. *Exp Dermatol* 16, 590-599.
- Akgül, B., Pfefferle, R., Marcuzzi, G.P., Zigrino, P., Krieg, T., Pfister, H., and Mauch, C. (2006). Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, MMP-13, and MT1-MMP in skin tumors of human papillomavirus type 8 transgenic mice. *Exp Dermatol* 15, 35-42.
- Alon, U., Barkai, N., Notterman, D.A., Gish, K., Ybarra, S., Mack, D., and Levine, A.J. (1999). Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6745-6750.
- Armstrong, B.K., and Kricker, A. (2001). The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 63, 8-18.
- Bao, J., and Zervos, A.S. (1996). Isolation and characterization of Nmi, a novel partner of Myc proteins. *Oncogene* 12, 2171-2176.
- Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., and Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 125, 279-284.
- Berezutskaya, E., and Bagchi, S. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 272, 30135-30140.
- Berkhout, R.J., Bouwes Bavinck, J.N., and ter Schegget, J. (2000). Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 38, 2087-2096.
- Birkeland, S.A., Storm, H.H., Lamm, L.U., Barlow, L., Blohme, I., Forsberg, B., Eklund, B., Fjeldborg, O., Friedberg, M., Frodin, L., and *et al.* (1995). Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer* 60, 183-189.
- Borsi, L., Carnemolla, B., Nicolo, G., Spina, B., Tanara, G., and Zardi, L. (1992). Expression of different tenascin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J Cancer* 52, 688-692.
- Boxman, I.L., Mulder, L.H., Russell, A., Bouwes Bavinck, J.N., Green, A., and Ter Schegget, J. (1999). Human papillomavirus type 5 is commonly present in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Br J Dermatol* 141, 246-249.
- Brink, A.A., Lloveras, B., Nindl, I., Heideman, D.A., Kramer, D., Pol, R., Fuente, M.J., Meijer, C.J., and Snijders, P.J. (2005). Development of a general-primer-PCR-reverse-line-blotting system for detection of beta and gamma cutaneous human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 43, 5581-5587.
- Bryant, D.M., and Stow, J.L. (2004). The ins and outs of E-cadherin trafficking. *Trends Cell Biol* 14, 427-434.

- Caldeira, S., Zehbe, I., Accardi, R., Malanchi, I., Dong, W., Giarre, M., de Villiers, E.M., Filotico, R., Boukamp, P., and Tommasino, M. (2003). The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J Virol* 77, 2195-2206.
- Cassarino, D.S., Derienzo, D.P., and Barr, R.J. (2006). Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification--part two. *J Cutan Pathol* 33, 261-279.
- Chen, J.G., Fleischer, A.B., Jr., Smith, E.D., Kancler, C., Goldman, N.D., Williford, P.M., and Feldman, S.R. (2001). Cost of nonmelanoma skin cancer treatment in the United States. *Dermatol Surg* 27, 1035-1038.
- Chien, A., Edgar, D.B., and Trela, J.M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127, 1550-1557.
- Chiquet-Ehrismann, R., Matsuoka, Y., Hofer, U., Spring, J., Bernasconi, C., and Chiquet, M. (1991). Tenascin variants: differential binding to fibronectin and distinct distribution in cell cultures and tissues. *Cell Regul* 2, 927-938.
- Chiquet, M., Vrucinic-Filipi, N., Schenk, S., Beck, K., and Chiquet-Ehrismann, R. (1991). Isolation of chick tenascin variants and fragments. A C-terminal heparin-binding fragment produced by cleavage of the extra domain from the largest subunit splicing variant. *Eur J Biochem* 199, 379-388.
- Corona, R. (1996). Epidemiology of nonmelanoma skin cancer: a review. *Ann Ist Super Sanita* 32, 37-42.
- Dang, C., Gottschling, M., Roewert, J., Forschner, T., Stockfleth, E., and Nindl, I. (2006a). Tenascin-C patterns and splice variants in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 155, 763-770.
- Dang, C., Koehler, A., Forschner, T., Sehr, P., Michael, K., Pawlita, M., Stockfleth, E., and Nindl, I. (2006b). E6/E7 expression of human papillomavirus types in cutaneous squamous cell dysplasia and carcinoma in immunosuppressed organ transplant recipients. *Br J Dermatol* 155, 129-136.
- Dazard, J.E., Gal, H., Amariglio, N., Rechavi, G., Domany, E., and Givol, D. (2003). Genome-wide comparison of human keratinocyte and squamous cell carcinoma responses to UVB irradiation: implications for skin and epithelial cancer. *Oncogene* 22, 2993-3006.
- de Gruijl, F.R. (1999). Skin cancer and solar UV radiation. *Eur J Cancer* 35, 2003-2009.
- de Jong-Tieben, L.M., Berkhout, R.J., ter Schegget, J., Vermeer, B.J., de Fijter, J.W., Bruijn, J.A., Westendorp, R.G., and Bouwes Bavinck, J.N. (2000). The prevalence of human papillomavirus DNA in benign keratotic skin lesions of renal transplant recipients with and without a history of skin cancer is equally high: a clinical study to assess risk factors for keratotic skin lesions and skin cancer. *Transplantation* 69, 44-49.
- de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., and zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.
- de Vries, E., Coebergh, J.W., and van der Rhee, H. (2006). [Trends, causes, approach and consequences related to the skin-cancer epidemic in the Netherlands and Europe]. *Ned Tijdschr Geneesk* 150, 1108-1115.
- Deau, M.C., Favre, M., Jablonska, S., Rueda, L.A., and Orth, G. (1993). Genetic heterogeneity of oncogenic human papillomavirus type 5 (HPV5) and phylogeny of HPV5 variants associated with epidermodysplasia verruciformis. *J Clin Microbiol* 31, 2918-2926.
- Deau, M.C., Favre, M., and Orth, G. (1991). Genetic heterogeneity among human papillomaviruses (HPV) associated with epidermodysplasia verruciformis: evidence for multiple allelic forms of HPV5 and HPV8 E6 genes. *Virology* 184, 492-503.
- Delsite, R., Kachhap, S., Anbazhagan, R., Gabrielson, E., and Singh, K.K. (2002). Nuclear genes involved in mitochondria-to-nucleus communication in breast cancer cells. *Mol Cancer* 1, 6.

- Diepgen, T.L., and Mahler, V. (2002). The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol* 146 Suppl 61, 1-6.
- Dooley, T.P., Reddy, S.P., Wilborn, T.W., and Davis, R.L. (2003). Biomarkers of human cutaneous squamous cell carcinoma from tissues and cell lines identified by DNA microarrays and qRT-PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 1026-1036.
- DSO (2007). Organspende und Transplantation in Deutschland. D.S. Organtransplantation, ed. (Neu-Isenburg: Deutsche Stiftung Organtransplantation).
- Dyson, N., Buchkovich, K., Whyte, P., and Harlow, E. (1989). Cellular proteins that are targeted by DNA tumor viruses for transformation. *Princess.Takamatsu.Symp.* 20, 191-198.
- Emoto, K., Yamada, Y., Sawada, H., Fujimoto, H., Ueno, M., Takayama, T., Kamada, K., Naito, A., Hirao, S., and Nakajima, Y. (2001). Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression: a prognostic marker in colorectal carcinoma. *Cancer* 92, 1419-1426.
- Erickson, H.P., and Bourdon, M.A. (1989). Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Annu Rev Cell Biol* 5, 71-92.
- Euvrard, S., Kanitakis, J., and Claudy, A. (2003). Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med* 348, 1681-1691.
- Feltkamp, M.C., Broer, R., di Summa, F.M., Struijk, L., van der Meijden, E., Verlaan, B.P., Westendorp, R.G., ter Schegget, J., Spaan, W.J., and Bouwes Bavinck, J.N. (2003). Seroreactivity to epidermodysplasia verruciformis-related human papillomavirus types is associated with nonmelanoma skin cancer. *Cancer Res* 63, 2695-2700.
- Forslund, O., Antonsson, A., Nordin, P., Stenquist, B., and Hansson, B.G. (1999). A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol* 80 (Pt 9), 2437-2443.
- Forslund, O., Ly, H., Reid, C., and Higgins, G. (2003). A broad spectrum of human papillomavirus types is present in the skin of Australian patients with non-melanoma skin cancers and solar keratosis. *Br J Dermatol* 149, 64-73.
- Fu, W., and Cockerell, C.J. (2003). The actinic (solar) keratosis: a 21st-century perspective. *Arch Dermatol* 139, 66-70.
- Fuchs, P.G., Iftner, T., Weninger, J., and Pfister, H. (1986). Epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus 8: genomic sequence and comparative analysis. *J.Virol.* 58, 626-634.
- Fuchs, P.G., and Pfister, H. (1994). Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirology* 37, 159-167.
- Gazzaniga, P., Nofroni, I., Gandini, O., Silvestri, I., Frati, L., Agliano, A.M., and Gradilone, A. (2005). Tenascin C and epidermal growth factor receptor as markers of circulating tumoral cells in bladder and colon cancer. *Oncol Rep* 14, 1199-1202.
- Giampieri, S., and Storey, A. (2004). Repair of UV-induced thymine dimers is compromised in cells expressing the E6 protein from human papillomaviruses types 5 and 18. *Br J Cancer* 90, 2203-2209.
- Gissmann, L. (1992). Human papillomaviruses and genital cancer. *Semin.Cancer Biol.* 3, 253-261.
- Gissmann, L., Boshart, M., Duerst, M., Ikenberg, H., Wagner, D., and zur Hausen, H. (1993). Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J.Invest.Dermatol.* 83, 1984-1984.
- Glas, J., Torok, H.P., Schneider, A., Brunnler, G., Kopp, R., Albert, E.D., Stolte, M., and Folwaczny, C. (2004). Allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene is associated with early gastric cancer. *J Clin Oncol* 22, 4746-4752.
- Gloster, H.M., Jr., and Brodland, D.G. (1996). The epidemiology of skin cancer. *Dermatol Surg* 22, 217-226.

- Gottschling, M., Kohler, A., Stockfleth, E., and Nindl, I. (2007). Phylogenetic analysis of beta-papillomaviruses as inferred from nucleotide and amino acid sequence data. *Mol Phylogenet Evol* 42, 213-222.
- Haller, K., Stubenrauch, F., and Pfister, H. (1995). Differentiation-dependent transcription of the epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus type 5 in benign lesions. *Virology* 214, 245-255.
- Hardiman, G. (2002). Microarray technologies -- an overview. The University of California San Diego Extension, Bioscience, Microarray Technologies -- an overview, March 13-15, 2002. *Pharmacogenomics* 3, 293-297.
- Harwood, C.A., McGregor, J.M., Proby, C.M., and Breuer, J. (1999). Human papillomavirus and the development of non-melanoma skin cancer. *J Clin Pathol* 52, 249-253.
- Harwood, C.A., Suretheran, T., McGregor, J.M., Spink, P.J., Leigh, I.M., Breuer, J., and Proby, C.M. (2000). Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Med Virol* 61, 289-297.
- Herold-Mende, C., Mueller, M.M., Bonsanto, M.M., Schmitt, H.P., Kunze, S., and Steiner, H.H. (2002). Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int J Cancer* 98, 362-369.
- Hindermann, W., Berndt, A., Borsi, L., Luo, X., Hyckel, P., Katenkamp, D., and Kosmehl, H. (1999). Synthesis and protein distribution of the unspliced large tenascin-C isoform in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 189, 475-480.
- Horikoshi, T., Danenberg, K.D., Stadlbauer, T.H., Volkenandt, M., Shea, L.C., Aigner, K., Gustavsson, B., Leichman, L., Frosing, R., Ray, M., and *et al.* (1992). Quantitation of thymidylate synthase, dihydrofolate reductase, and DT-diaphorase gene expression in human tumors using the polymerase chain reaction. *Cancer Res* 52, 108-116.
- Iftner, T., Elbel, M., Schopp, B., Hiller, T., Loizou, J.I., Caldecott, K.W., and Stubenrauch, F. (2002). Interference of papillomavirus E6 protein with single-strand break repair by interaction with XRCC1. *Embo J* 21, 4741-4748.
- Ismail, R.S., Baldwin, R.L., Fang, J., Browning, D., Karlan, B.Y., Gasson, J.C., and Chang, D.D. (2000). Differential gene expression between normal and tumor-derived ovarian epithelial cells. *Cancer Res* 60, 6744-6749.
- Jablonska, S., Dabrowski, J., and Jakubowicz, K. (1972). Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer Res* 32, 583-589.
- Jablonska, S., and Majewski, S. (1994). Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 186, 157-175.
- Jackson, S., Harwood, C., Thomas, M., Banks, L., and Storey, A. (2000). Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev* 14, 3065-3073.
- Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M. (2005). Trends in the leading causes of death in the United States, 1970–2002. *JAMA.* 294, 1255–1259.
- Jensen, P., Hansen, S., Moller, B., Leivestad, T., Pfeffer, P., Geiran, O., Fauchald, P., and Simonsen, S. (1999). Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *J Am Acad Dermatol* 40, 177-186.
- Jeronimo, C., Nomoto, S., Caballero, O.L., Usadel, H., Henrique, R., Varzim, G., Oliveira, J., Lopes, C., Fliss, M.S., and Sidransky, D. (2001). Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. *Oncogene* 20, 5195-5198.
- Jones, F.S., Burgoon, M.P., Hoffman, S., Crossin, K.L., Cunningham, B.A., and Edelman, G.M. (1988). A cDNA clone for cytotactin contains sequences similar to epidermal growth factor-like repeats and segments of fibronectin and fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2186-2190.

- Jones, F.S., and Jones, P.L. (2000). The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 218, 235-259.
- Jones, P.L. (2001). Extracellular matrix and tenascin-C in pathogenesis of breast cancer. *Lancet* 357, 1992-1994.
- Kalembeyi, I., Inada, H., Nishiura, R., Imanaka-Yoshida, K., Sakakura, T., and Yoshida, T. (2003). Tenascin-C upregulates matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cells: direct and synergistic effects with transforming growth factor beta1. *Int J Cancer* 105, 53-60.
- Karagas, M.R., Greenberg, E.R., Spencer, S.K., Stukel, T.A., and Mott, L.A. (1999). Increase in incidence rates of basal cell and squamous cell skin cancer in New Hampshire, USA. New Hampshire Skin Cancer Study Group. *Int J Cancer* 81, 555-559.
- Karagas, M.R., Nelson, H.H., Sehr, P., Waterboer, T., Stukel, T.A., Andrew, A., Green, A.C., Bavinck, J.N., Perry, A., Spencer, S., *et al.* (2006). Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *J Natl Cancer Inst* 98, 389-395.
- Katenkamp, K., Berndt, A., Hindermann, W., Wunderlich, H., Haas, K.M., Borsi, L., Zardi, L., and Kosmehl, H. (2004). mRNA expression and protein distribution of the unspliced tenascin-C isoform in prostatic adenocarcinoma. *J Pathol* 203, 771-779.
- Katalinic A, Kunze U, Schafer T. (2003). Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). *Br J Dermatol* 149, 1200–1206.
- Koljonen, V., Jähkola, T., Tukiainen, E., Granroth, G., Haglund, C., and Böbling, T. (2005). Tenascin-C in primary Merkel cell carcinoma. *J Clin Pathol* 58, 297-300.
- Korshunov, A., Golanov, A., and Timirgazi, V. (2000). Immunohistochemical markers for intracranial ependymoma recurrence. An analysis of 88 cases. *J Neurol Sci* 177, 72-82.
- Koukoulis, G.K., Gould, V.E., Bhattacharyya, A., Gould, J.E., Howedy, A.A., and Virtanen, I. (1991). Tenascin in normal, reactive, hyperplastic, and neoplastic tissues: biologic and pathologic implications. *Hum Pathol* 22, 636-643.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Latijnhouwers, M.A., Bergers, M., Van Bergen, B.H., Spruijt, K.I., Andriessen, M.P., and Schalkwijk, J. (1996). Tenascin expression during wound healing in human skin. *J Pathol* 178, 30-35.
- Latijnhouwers, M.A., de Jongh, G.J., Bergers, M., de Rooij, M.J., and Schalkwijk, J. (2000). Expression of tenascin-C splice variants by human skin cells. *Arch Dermatol Res* 292, 446-454.
- Li, H., Lee, T.H., and Avraham, H. (2002). A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) promoter activity in breast cancer. *J Biol Chem* 277, 20965-20973.
- Li, L., Elledge, S.J., Peterson, C.A., Bales, E.S., and Legerski, R.J. (1994). Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5012-5016.
- Lightner, V.A., Gumkowski, F., Bigner, D.D., and Erickson, H.P. (1989). Tenascin/hexabrachion in human skin: biochemical identification and localization by light and electron microscopy. *J Cell Biol* 108, 2483-2493.
- Macaluso, M., Russo, G., Cinti, C., Bazan, V., Gebbia, N., and Russo, A. (2002). Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol* 192, 125-130.
- Machida, N., Umikawa, M., Takei, K., Sakima, N., Myagmar, B.E., Taira, K., Uezato, H., Ogawa, Y., and Kariya, K. (2004). Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 as a putative effector of Rap2 to activate the c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 279, 15711-15714.

- Mackie, E.J., Halfter, W., and Liverani, D. (1988). Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol* 107, 2757-2767.
- Martin, K.J., Kritzman, B.M., Price, L.M., Koh, B., Kwan, C.P., Zhang, X., Mackay, A., O'Hare, M.J., Kaelin, C.M., Mutter, G.L., *et al.* (2000). Linking gene expression patterns to therapeutic groups in breast cancer. *Cancer Res* 60, 2232-2238.
- Meyer, T., Arndt, R., Christophers, E., Nindl, I., and Stockfleth, E. (2001). Importance of human papillomaviruses for the development of skin cancer. *Cancer Detect Prev* 25, 533-547.
- Miller, D.L., and Weinstock, M.A. (1994). Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. *J Am Acad Dermatol* 30, 774-778.
- Moloney, F.J., Comber, H., O'Lorcain, P., O'Kelly, P., Conlon, P.J., and Murphy, G.M. (2006). A population-based study of skin cancer incidence and prevalence in renal transplant recipients. *Br J Dermatol* 154, 498-504.
- Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-350.
- Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., and Meijer, C.J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348, 518-527.
- Muscardin, L.M., Poggiali, F., Balus, L., and Venuti, A. (2001). HPV5b variant in a neoplastic lesion of an Italian patient affected by epidermodysplasia verruciformis. *Eur J Dermatol* 11, 572-575.
- Nagase, H., and Woessner, J.F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274, 21491-21494.
- Nindl, I., Dang, C., Forschner, T., Kuban, R.J., Meyer, T., Sterry, W., and Stockfleth, E. (2006). Identification of differentially expressed genes in cutaneous squamous cell carcinoma by microarray expression profiling. *Mol Cancer* 5, 30.
- Nindl, I., Gottschling, M., and Stockfleth, E. (2007). Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: basic virology and clinical manifestations. *Dis Markers* 23, 247-259.
- Obiri, N.I., Siegel, J.P., Varricchio, F., and Puri, R.K. (1994). Expression of high-affinity IL-4 receptors on human melanoma, ovarian and breast carcinoma cells. *Clin Exp Immunol* 95, 148-155.
- Ong, C.H., and Bateman, A. (2003). Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, acrogranin) in proliferation and tumorigenesis. *Histol Histopathol* 18, 1275-1288.
- Orend, G., and Chiquet-Ehrismann, R. (2000). Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Exp Cell Res* 261, 104-110.
- Orth, G. (2006). Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses. *Semin Immunol* 18, 362-374.
- Orth, G., Jablonska, S., Favre, M., Croissant, O., Jarzabek Chorzelska, M., and Rzeska, G. (1978). Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 75, 1537-1541.
- Papachristou, D.J., Batistatou, A., Sykiotis, G.P., Varakis, I., and Papavassiliou, A.G. (2003). Activation of the JNK-AP-1 signal transduction pathway is associated with pathogenesis and progression of human osteosarcomas. *Bone* 32, 364-371.
- Park, C.H., and Sancar, A. (1994). Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1, and ERCC4(XPF) excision repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5017-5021.
- Pfister, H. (1992). Human papillomaviruses and skin cancer. *Semin.Cancer Biol.* 3, 263-271.
- Pfister, H., and Fuchs, P.G. (1987). Papillomaviruses and human diseases. In *Papillomaviruses: particles, genome organization and proteins*, K. Syrjanen, L. Gissmann, and L.G. Koss, eds. (Berlin: Springer-Verlag), pp. 1-18.

- Pfister, H., and Fuchs, P.G. (1994). Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology* 37, 143-149.
- Pfister, H., Fuchs, P.G., Majewski, S., Jablonska, S., Pniewska, I., and Malejczyk, M. (2003). High prevalence of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in actinic keratoses of the immunocompetent population. *Arch Dermatol Res* 295, 273-279.
- Pfister, H., and Schegget, J.T. (1997). Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin.Dermatol.* 15, 335-347.
- Potratz, A., Huttler, S., Bierfreund, U., Proia, R.L., Suzuki, K., and Sandhoff, K. (2000). Quantification of mRNAs encoding proteins of the glycosphingolipid catabolism in mouse models of GM2 gangliosidoses and sphingolipid activator protein precursor (prosaposin) deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1502, 391-397.
- Prieto, A.L., Jones, F.S., Cunningham, B.A., Crossin, K.L., and Edelman, G.M. (1990). Localization during development of alternatively spliced forms of cytactin mRNA by in situ hybridization. *J Cell Biol* 111, 685-698.
- Purdie, K.J., Pennington, J., Proby, C.M., Khalaf, S., de Villiers, E.M., Leigh, I.M., and Storey, A. (1999). The promoter of a novel human papillomavirus (HPV77) associated with skin cancer displays UV responsiveness, which is mediated through a consensus p53 binding sequence. *Embo J* 18, 5359-5369.
- Purdie, K.J., Suretheran, T., Sterling, J.C., Bell, L., McGregor, J.M., Proby, C.M., Harwood, C.A., and Breuer, J. (2005). Human papillomavirus gene expression in cutaneous squamous cell carcinomas from immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J Invest Dermatol* 125, 98-107.
- Riedl, S., Kadmon, M., Tandara, A., Hinz, U., Moller, P., and Faissner, A. (1997). Tenascin-C tissue concentration in inflammatory and neoplastic diseases of the colon mucosa. *Anticancer Res* 17, 3165-3166.
- Rubin, J.S., Joyner, A.L., Bernstein, A., and Whitmore, G.F. (1983). Molecular identification of a human DNA repair gene following DNA-mediated gene transfer. *Nature* 306, 206-208.
- Russell, M., and Hoeffler, J.P. (1996). Signal transduction and the regulation of cell growth. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1, 119-122.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Schalkwijk, J., Van Vlijmen, I., Oosterling, B., Perret, C., Koopman, R., Van den Born, J., and Mackie, E.J. (1991). Tenascin expression in hyperproliferative skin diseases. *Br J Dermatol* 124, 13-20.
- Schaper, I.D., Marcuzzi, G.P., Weissenborn, S.J., Kasper, H.U., Dries, V., Smyth, N., Fuchs, P., and Pfister, H. (2005). Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8. *Cancer Res* 65, 1394-1400.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., and Howley, P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.
- Shah, K.V., Kesis, T.D., Shah, F., Gupta, J.W., Shibata, D., and Jones, R.W. (1996). Human papillomavirus investigation of patients with cervical intraepithelial neoplasia 3, some of whom progressed to invasive cancer. *Int.J.Gynecol.Pathol.* 15, 127-130.
- Shamanin, V., Glover, M., Rausch, C., Proby, C., Leigh, I.M., zur Hausen, H., and de Villiers, E.M. (1994). Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients. *Cancer Res* 54, 4610-4613.
- Shau, H., Butterfield, L.H., Chiu, R., and Kim, A. (1994). Cloning and sequence analysis of candidate human natural killer-enhancing factor genes. *Immunogenetics* 40, 129-134.
- Shikata, N., Oyaizu, T., Andachi, H., and Tsubura, A. (1994). Tenascin expression in normal human adult skin and skin appendage tumours. *Virchows Arch* 424, 511-516.

- Shimamura, T., Husain, S.R., and Puri, R.K. (2006). The IL-4 and IL-13 pseudomonas exotoxins: new hope for brain tumor therapy. *Neurosurg Focus* 20, E11.
- Smahel, M., Tejklova, P., Smahelova, J., Polakova, I., and Mackova, J. (2007). Mutation in the immunodominant epitope of the HPV16 E7 oncoprotein as a mechanism of tumor escape. *Cancer Immunol Immunother*.
- Staples, M.P., Elwood, M., Burton, R.C., Williams, J.L., Marks, R., and Giles, G.G. (2006). Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust* 184, 6-10.
- Tato, C.M., and O'Shea, J.J. (2006). Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature* 441, 166-168.
- Tseleni-Balafouta, S., Gakiopoulou, H., Fanourakis, G., Voutsinas, G., Balafoutas, D., and Patsouris, E. (2006). Tenascin-C protein expression and mRNA splice variants in thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol* 80, 177-182.
- Tsukifuji, R., Tagawa, K., Hatamochi, A., and Shinkai, H. (1999). Expression of matrix metalloproteinase-1, -2 and -3 in squamous cell carcinoma and actinic keratosis. *Br J Cancer* 80, 1087-1091.
- Tsunoda, T., Inada, H., Kalembeiyi, I., Imanaka-Yoshida, K., Sakakibara, M., Okada, R., Katsuta, K., Sakakura, T., Majima, Y., and Yoshida, T. (2003). Involvement of large tenascin-C splice variants in breast cancer progression. *Am J Pathol* 162, 1857-1867.
- Tuominen, H., and Kallioinen, M. (1994). Increased tenascin expression in melanocytic tumors. *J Cutan Pathol* 21, 424-429.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5116-5121.
- Ulrich, C., Schmook, T., Nindl, I., Meyer, T., Sterry, W., and Stockfleth, E. (2003). Cutaneous precancers in organ transplant recipients: an old enemy in a new surrounding. *Br J Dermatol* 149 Suppl 66, 40-42.
- van den Brule, A.J., Pol, R., Fransen-Daalmeijer, N., Schouls, L.M., Meijer, C.J., and Snijders, P.J. (2002). GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* 40, 779-787.
- van Duin, M., de Wit, J., Odijk, H., Westerveld, A., Yasui, A., Koken, H.M., Hoeijmakers, J.H., and Bootsma, D. (1986). Molecular characterization of the human excision repair gene ERCC-1: cDNA cloning and amino acid homology with the yeast DNA repair gene RAD10. *Cell* 44, 913-923.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Vingron, M., and Hoheisel, J. (1999). Computational aspects of expression data. *J Mol Med* 77, 3-7.
- Wallraff, J. (1963). *Leitfaden der Histologie des Menschen*. (München-Berlin: Verlag von Urban und Schwarzenberg), p. T83.
- Weissenborn, S.J., Nindl, I., Purdie, K., Harwood, C., Proby, C., Breuer, J., Majewski, S., Pfister, H., and Wieland, U. (2005). Human papillomavirus-DNA loads in actinic keratoses exceed those in non-melanoma skin cancers. *J Invest Dermatol* 125, 93-97.
- Werness, B.A., Levine, A.J., and Howley, P.M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248, 76-79.
- Wilson, C.A., Holmes, S.C., Campo, M.S., White, S.I., Tillman, D., Mackie, R.M., and Thomson, J. (1989). Novel variants of human papillomavirus type 2 in warts from immunocompromised individuals. *Br J Dermatol* 121, 571-576.
- Witkin, S.S., Gerber, S., and Ledger, W.J. (2002). Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis* 34, 204-209.

- Wu, Z., and Irizarry, R.A. (2004). Preprocessing of oligonucleotide array data. *Nat Biotechnol* 22, 656-658; author reply 658.
- Yabe, Y., Sakai, A., Hitsumoto, T., Kato, H., and Ogura, H. (1991). A subtype of human papillomavirus 5 (HPV-5b) and its subgenomic segment amplified in a carcinoma: nucleotide sequences and genomic organizations. *Virology* 183, 793-798.
- Yu, F., Yang, G., Zhao, Z., Ji, L., Cao, Y., Bai, L., Lu, F., Fu, H., Huang, B., Li, H., *et al.* (2007). Apoptosis related protein 3, an ATRA-upregulated membrane protein arrests the cell cycle at G1/S phase by decreasing the expression of cyclin D1. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 1041-1046.
- Zhang, L., Zhou, W., Velculescu, V.E., Kern, S.E., Hruban, R.H., Hamilton, S.R., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276, 1268-1272.
- Zhu, F., Yan, W., Zhao, Z.L., Chai, Y.B., Lu, F., Wang, Q., Peng, W.D., Yang, A.G., and Wang, C.J. (2000). Improved PCR-based subtractive hybridization strategy for cloning differentially expressed genes. *Biotechniques* 29, 310-313.
- Zhu, M., John, S., Berg, M., and Leonard, W.J. (1999). Functional association of Nmi with Stat5 and Stat1 in IL-2- and IFNgamma-mediated signaling. *Cell* 96, 121-130.
- zur Hausen, H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92, 690-698.

7 ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Chantip Dang-Heine, geboren am 21. April 1976 in Battambang/Kambodscha, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 25. Aug. 09

8 PUBLIKATIONEN

Dang C, Koehler A, Forschner T, Sehr P, Michael K, Pawlita M, Stockfleth E and Nindl I (2006) E6/E7 expression of human papillomavirus types in cutaneous squamous cell dysplasia and carcinoma in immunosuppressed organ transplant recipients. *Br J Dermatol*, 155: 129-136.

Dang C, Gottschling M, Roewert J, Forschner T, Stockfleth E and Nindl I (2006) Tenascin-C patterns and splice variants in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*, 155(4):763-70.

Dang C, Gottschling M, Manning K, O'Curraín E, Schneider S, Sterry W, Stockfleth E and Nindl I (2006) Identification of dysregulated genes in cutaneous squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 16: 513-519.

Nindl I, **Dang C**, Forschner T, Kuban RJ, Meyer T, Sterry W and Stockfleth E (2006) Identification of different expressed genes in cutaneous squamous cell carcinoma by microarray expression profiling. *Mol Cancer*, 8;5:30.

9 ANHANG

Tabelle 10: Hautproben von SCC-Patienten für die Tn-C-Analysen

Nr.	G.	Alter	TX	Histologie	Lokalisation
1	w	63 J.	N-TX	normal	Kopf
2	m	60 J.	N-TX	normal	Wange
3	w	72 J.	N-TX	normal	Gesicht
4	w	71 J.	N-TX	normal	Nase
5	w	62 J.	N-TX	normal	Wange
6	w	68 J.	N-TX	normal	Hals
7	w	60 J.	N-TX	normal	Wange
8	m	60 J.	N-TX	normal	Schulter
9	m	59 J.	N-TX	normal	Kopf
10	w	66 J.	N-TX	normal	Schläfe
11	m	63 J.	N-TX	normal	Leise
12	w	50 J.	N-TX	normal	Unterlid
13	m	79 J.	N-TX	normal	Schulter
14	w	64 J.	N-TX	normal	Oberarm
15	m	54 J.	N-TX	normal	Rücken
16	m	52 J.	N-TX	normal	Rücken
17	m	68 J.	N-TX	normal	Rücken
18	m	55 J.	Niere	normal	Oberschenkel
19	m	69 J.	N-TX	normal	Gesicht
20	w	76 J.	N-TX	normal	Hals
21	m	75 J.	Niere	normal	Unterschenkel
22	m	70 J.	N-TX	normal	Rücken
23	w	80 J.	N-TX	normal	Stirn
24	m	50 J.	N-TX	normal	Stirn
25	m	85 J.	N-TX	normal	Kopf
26	m	74 J.	N-TX	AK	Hand
27	w	57 J.	Niere	AK	Rücken
28	m	70 J.	Niere	AK	Schläfe
29	m	59 J.	N-TX	AK	Unterschenkel
30	m	55 J.	Niere	AK	Oberschenkel
31	m	67 J.	N-TX	AK	Kopf
32	m	67 J.	N-TX	AK	Kopf
33	m	55 J.	N-TX	AK	Kopf
34	m	57 J.	Herz	AK	Kopf
35	m	57 J.	Herz	AK	Handrücken
36	m	77 J.	N-TX	AK	Vertex
37	m	64 J.	N-TX	AK	Kopf
38	m	63 J.	N-TX	AK	Wange
39	m	83 J.	N-TX	AK	Vertex
40	m	69 J.	N-TX	AK	Stirn

AK, Aktinische Keratose; BCC, *basal cell carcinoma*; G., Geschlecht; J., Jahr; m, männlich; NMSC, *non-melanoma skin cancer*; Nr., Nummer; Pat., Patient; SCC, *squamous cell carcinoma*; TX, Transplantation; w, weiblich; Vv, Warze

Anhang

Nr.	G.	Alter	TX	Histologie	Lokalisation
41	m	60 J.	Herz	AK	Ohr.
42	m	75 J.	Niere	AK	Schulterblatt
43	m	84 J.	N-TX	AK	Wange
44	m	78 J.	N-TX	AK	Ohrhelix
45	w	57 J.	Niere	SCC	Handrücken
46	w	57 J.	Niere	SCC	Ringfinger
47	m	84 J.	N-TX	SCC	Schläfe
48	w	61 J.	N-TX	SCC	Wange
49	w	69 J.	N-TX	SCC	Decollete
50	w	73 J.	N-TX	SCC	Stirn
51	m	57 J.	N-TX	SCC	Stirn
52	m	73 J.	N-TX	SCC	Ohrhelix
53	w	54 J.	Niere	SCC	Finger
54	m	74 J.	N-TX	SCC	Handrücken
55	w	80 J.	N-TX	SCC	Kopf
56	m	46 J.	Niere	SCC	Hand
57	m	79 J.	N-TX	SCC	Ohr
58	m	82 J.	N-TX	SCC	Hinterkopf
59	m	55 J.	Niere	SCC	Hand
60	w	57 J.	Niere	SCC	Handrücken
61	m	94 J.	N-TX	SCC	Kopf
62	m	82 J.	N-TX	SCC	Hand
63	m	68 J.	N-TX	SCC	Stirn
64	m	63 J.	N-TX	SCC	Stirn
65	m	68 J.	N-TX	SCC	Stirn
66	w	67 J.	N-TX	SCC	Unterschenkel

AK, Aktinische Keratose; BCC, *basal cell carcinoma*; G., Geschlecht; J.; Jahr; m, männlich; NMSC, *non-melanoma skin cancer*; Nr., Nummer; Pat., Patient; SCC, *squamous cell carcinoma*; TX, Transplantation; w, weiblich; Vv, Warze

Tabelle 11: Funktion und Expression der in SCC differenziell regulierten Gene

A) Hochregulierte Gene in NMSC (n=42).

	Nr.	Accession Nr.	Symbol	Gen	Funktion	Chromosom	Fold Change T/N	Signal (gesund)	Signal (NMSC)
Differenzierung									
	1	AF183421.1	rab22b	Small GTP-bindung protein rab22 (RAB31)	Signal Transduktion GTPase abhängiger Signalwege.	18p11.3	1.87	6853	12495
	2	NM_006868.1	RAB31*	RAB31, RAS Onkogene Familie	Signal Transduktion GTPase abhängiger Signalwege.	18p11.3	3.30	2637	8437
Apoptose									
	3	NM_004834.1	MAP4K4*	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	Aktiviert MAP-Kinase MAPK8/JNK des JAK-STAT-Signalweges.	2q11.2-q12	2.65	1475	3898
Proliferation									
	4	NM_007375.1	TARDBP	TAR DNA binding protein	Transkriptionaler Repressor chromosomal integrierter TAR DNA und Repressor von HIV-1 Transkription.	1p36.22	1.48	6779	10441
Stoffwechsel									
	5	D55674.1	hnRNP D	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	Partner von pre-mRNAs im Kern und mgl. Einfluss auf prä-mRNA Prozessierung, Metabolisierung und Transport.	4q21.1-q21.2	1.64	4020	6968
	6	NM_003942.1	RPS6KA4	Ribosomal protein S6 kinase	Serin/threonin kinase.	11q11-q13	1.74	3374	6029
	7	NM_001814.1	CTSC	Cathepsin C (CTSC)	Proteindefekt resultiert in Papillon-Lefevre Syndrom (autosomal rezessive Krankheit mit palmoplantarer Keratosis und Periodontitis.	11q14.1-q14.3	1.64	11435	18686
	8	Z14077.1	YY1	YY1, NF-E1 protein	Pluripotenter Transkriptionsfaktor	14q	2.08	4185	8939
	9	NM_006141.1	DNCLI2	Dynein, cytoplasmic, light intermediate polypeptide 2	Mitose-assoziiierter Zellorganelltransport.	16q22.1	3.23	2225	5692

Anhang

10	AF061832.1	M4	M4 protein deletion mutant	Mgl. pre-mRNA Prozessierung und Metabolisierung.	19p13.3-p13.2	1.29	11154	14824
Zellkommuni-kation								
11	U65590	IL-1RN*	IL-1 receptor antagonist IL-1Ra	Inhibitor von Interleukin 1 α und 1 β .	2q14.2	1.75	9599	18079
12	NM_004688.1	NMI*	N-myc (and STAT) interactor	Interagiert mit N-MYC , C-MYC und allen STATs (signal transducers of activated T cells) außer STAT2.	2p24.3-q21.3	2.33	2744	6248
13	NM_002416.1	MIG	Monokine induced by gamma interferon	Ligand von CXCR3. Pleiotrope Wirkungen, u.a. Aktivierung von Monozyten, NK-Zellen und Lymphozyten-migration.	4q21	3.54	1492	10529
14	U72069.1	TNPO1	Karyopherin beta2	Interagiert mit Kern-lenksequenzen folgend im Proteintransport in den Zellkern.	5q13.2	2.06	2986	6049
15	BC004489.1	HLA-C	Major histocompatibility complex, class I,C	MHC-I assoziierte Präsentation von Peptiden aus dem ER-Lumen können starke Immunreaktionen auslösen.	6p21.3	1.30	78196	106054
16	L42024.1	HLA-B39	MHC, HLA-B39	Dito.	6p21.3	1.35	78040	114101
17	NM_005516.1	HLA-E	Major histocompatibility complex, class I, E	Dito.	6p21.3	1.76	24252	43847
18	NM_006096.1	NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1	Partizipiert in Stressantworten, Hormonsignaling, Zellwachstum und - differenzierung.	8q24.3	2.60	17233	44914
19	AF313468.1	lectin-1	Dendritic cell-associated C-type lectin-1	Adhäsionsmolekül in Immunreaktionen.	12p12.3-p13.2	3.61	1163	4146
20	U88964	HEM45	HEM45	Interferon-responder Gen, hochreguliert von HIV-1 Tat.	15q26	3.24	982	3293
21	NM_000418.1	IL4R*	Interleukin 4 receptor	Schlüsselmolekül in Typ-I-Immunreaktionen und monozytärer Zelldifferenzierung.	16p11.2-12.1	2.41	2519	6159
22	NM_015986.1	CREME9	Cytokine receptor-like molecule 9	Mgl. Signaltransduktionmolekül.	17q11.2	1.58	4335	6950
23	NM_002087.1	GRN*	Granulin	Onkogen in Prostata intraepithelialer Neoplasie.	17q21.32	1.77	14453	25978
Adhäsion								
24	AK023406.1	FLJ13344	FLJ13344 fis	Homologes Protein zu ABP620, das Aktin und Microtubuli bindet.	1p32-p31	2.49	3656	9107
25	U03271	CAPZB	F-actin capping protein beta subunit	Regulator des Aktin-Wachstums auf post-translationaler Ebene.	1p36.1	1.35	11809	16060
26	NM_005572.1	LMNA	Lamin AC	Wahrscheinlich Zellkern- und Chromatinstruktur stabilisierendes Protein.	1q21.2-q21.3	1.47	13531	19844
27	AB010427.2	WDR1	NORI-1	Wahrscheinlich Aktin-destruktion.	4p16.1	2.11	7418	15927

Anhang

28	NM_004893.1	H2AFY	H2A histone family, member Y	Protein der Histone H2A Familie.	5q31.3-q32	1.39	18975	26758
29	NM_001101.2	ACTB	Actin, beta	Konserviertes Zytoskelettprotein.	7p15-p12	1.44	120864	178342
30	NM_000700.1	ANXA1	Annexin A1	Protein auf der zytosolischen Seite der Zellwand.	9q12-q21.2	1.74	35910	64023
31	NM_002160.1	TNC*	Hexabrachion (tenascin C, cytactin)	Tn-C Spleißvarianten vermitteln Tumorinvasion und –adhäsion in Brustkrebs.	9q33	4.60	1819	8694
32	BF338947	1-8U	Interferon induced transmembrane protein 3	Interferon-induziertes Transmembranprotein.	11p15.5	1.70	20588	33223
33	NM_002421.2	MMP1*	Matrix metallo-proteinase 1 = Kollagenase Human 56k	Enzym, das Kollagen abbaut und damit Gewebeumbau ausführt. In embryonaler Entwicklung, Reproduktion wie auch Arthritis und Metastasierung aktiv.	11q22.3	> 10	293	18006
34	J00269.1	KRT6A	cytoskeletal type II keratin	Gehört zur Familie der Keratinproteine.	12q12-q13	3.79	42604	161154
35	NM_006825.1	CKAP4	Transmembran-protein	Zelladhäsion über hochaffine Bindung an APF.	12q24.11	1.68	12780	22154
36	NM_005561.2	LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1	CD107a involviert in NK-Zellvermittelte Zellyse.	13q34	1.28	25495	33858
37	NM_001793.1	CDH3	Cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)	Calcium-abh. Zelladhäsionsprotein. Proteindefekt resultiert in angeborener Hypotrichosis und juveniler Macula- dystrophie.	16q22.1	3.63	3819	15934
38	NM_004360.1	CDH1*	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	Calcium-abh. Zelladhäsionsprotein. Proteindefekt resultiert in diversen Malignomen (Magen, Brust, Schilddrüse, Colorektal, Ovarien).	16q22.1	1.31	18773	24888
39	BC001920.1	actin gamma	Actin, gamma 1	Zytoskelettprotein. Involviert in Zellbewegung.	17q25	1.38	108509	152446
40	NM_001614.2	ACTG1	Actin, gamma 1	Zytoskelettprotein. Involviert in Zellbewegung.	17q25	1.43	113681	166361
41	NM_004368.1	CNN2	Calponin 2	Zelladhäsion, Bindung von Aktin und Kontraktion glatter Muskulatur.	21q11.1	1.43	4012	5822
42	NM_004994.1	MMP9	Matrix metallo-proteinase 9 (gelatinase B, collagenase)	Typ-IV-Kollagenase. Enzymatischer Abbau von Kollagen. In embryonaler Entwicklung, Reproduktion wie auch Arthritis und Metastasierung aktiv.	20q11.2-q13.1	4.70	3150	16961

Anhang

B) Herunterregulierte Gene in NMSC verglichen mit normaler Haut (n=76).

Nr.	Accession Nr	Symbol	Gen	Funktion	Chromosom	Fold Change N/T	Signal (gesund)	Signal (NMSC)
Differenzierung								
1	NM_004430.1	EGR3	Early growth response 3	involviert in der transkriptionalen Regulation von Zellzyklusgenen.	8p23-p21	2.22	7833	3782
2	NM_022969.1	FGFR2	Fibroblast growth factor receptor 2	Einfluss auf Zellteilung und –differenzierung.	10q26	2.04	9967	5011
3	BC001971.1	p27, Kip1	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	Bindet und verhindert die Aktivierung von Cyclin E-CDK2 oder cyclin D-CDK4 resultierend in vermindertem Zellzyklus Progress zur G1-Phase.	12p13.1-p12	1.45	8234	5959
4	AF309553.1	REC14	Meiotic recombination protein REC14	mgl. Zelldifferenzierungsfaktor.	15q24.1	1.96	16148	8395
5	NM_001424.1	EMP2	Epithelial membrane protein 2	mgl. involviert in Zellproliferation, Zell-differenzierung, Zelltod.	16p13.2	2.00	21074	11007
6	NM_001983.1	ERCC1*	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency	DNA-Reparaturprotein. Expression in Hodenkrebs reduziert.	19q13.2-q13.3	1.79	7222	4073
Apoptose								
7	NM_016085.1	APR-3 ^{n.s.}	Apoptosis related protein APR-3	Apoptosis, Hämatopoese.	2p23.3	1.85	21640	11863
8	AF279903.1	EC45	60S ribosomal protein L15	Ribosolmales Protein der 60S Untereinheit.	3p24.1	1.85	60783	36597
9	NM_002948.1	RPL15	Ribosomal protein L15	Ribosolmales Protein der 60S Untereinheit; in Ösophagus-CA differenziell reguliert.	3p24.1	1.79	79109	46326
10	NM_001023.1	RPS20	Ribosomal protein S20	Ribosolmales Protein der 40S Untereinheit.	8q12	1.35	78126	58507
11	AB055804.1	MM-1 beta	MM-1 beta	mgl. Repressor der transkriptionellen Aktivität von c-myc.	12q12	1.64	35682	22035
12	NM_015965.1	CGI-39*	CGI-39 protein; cell death-regulatory protein GRIM19	Retinoid-interferon induziertes Gen, das Apoptose auslösen kann.	19p13.2	1.43	12888	9485
Proliferation								

Anhang

13	BC003689.1	HMG 17	High-mobility group (non-histone chromosomal protein 17)	Nukleosomales Bindungsprotein.	1p36.1	1.22	46229	38384
14	NM_006694.1	JTB	Jumping translocation breakpoint	In Hepatozellulärem Karzinom hochreguliert (HCC).	1q21	1.39	26313	19283
15	NM_001967.2	EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A	Proteintranslationinitiationsfaktor.	3q28	1.92	41342	22341
16	NM_005935.1	MLLT2	Myeloidlymphoid or mixed-lineage leukemia	mgl. Inhibitor der Zelltodresistenz.	4q21	1.82	14146	8083
17	NM_000995.1	RPL34	Ribosomal protein L34	Ribosomales Protein der 60S Untereinheit.	4q25	1.85	92356	52954
18	NM_006098.1	GNB2L1	Guanine nucleotide binding protein (G protein)	Regulator der G1/S-Progression über Hemmung der Src Kinaseaktivität.	5q35.3	1.32	73713	57754
19	NM_007104.2	RPL10A	Ribosomal protein L10a	Cyclosporin-A responsives Gen im Thymus.	6p21.3-p21.2	1.49	77178	54218
20	BC000734.1	EIF3S6	Eukaryotic translation initiation factor 3	Proteintranslation.	8q22-q23	1.38	51705	37233
21	NM_003756.1	EIF3S3	Eukaryotic translation initiation factor 3	Proteintranslation.	8q24.11	1.49	38725	25795
22	BC000524.1	RPS6	Ribosomal protein S6	Ribosomales Protein der 40S Untereinheit.	9p21	1.23	99499	83221
23	NM_001417.1	EIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B	Verstärker der Nukleaseaktivität vom Herpes simplex virus.	12q13.13	1.35	15184	11509
24	NM_000968.1	RPL4	Ribosomal protein L4	Ribosomales Protein der 60S Untereinheit.	15q22	1.30	118180	92600
25	NM_015920.1	LOC51065	40S ribosomal protein S27	Ähnlichkeit mit dem ribosomalem Protein S27.	15q22.1	1.67	24852	15517
26	NM_001009.1	RPS5	Ribosomal protein S5	Mgl. differenziell reguliertes Gen bei Kolon-CA.	19q13.4	1.54	57497	38110
27	NM_016091.1	HSPC025	HSPC025	Interagiert mit Int-6 und ist assoziiert mit eukaryotic translation initiation factor 3.	22q	1.45	58905	41562
28	L22453.1	TARBP-b	HIV-1 TAR RNA binding protein (RPL3)	Ribosomales Protein der 60S Untereinheit; Bindung an HIV-1 TAR mRNA kann Transaktivierung von Zielgenen bewirken.	22q13	1.47	86865	59742
29	NM_006013.1	RPL10	Ribosomal protein L10	Ribosomales Protein der 60S Untereinheit.	Xq28	1.27	127604	102770

Anhang

	30	NM_014315.1	LCP	host cell factor homolog	Transkriptioneller Coaktivator, der virale und Wirtstranskriptionskomplexe zusammenführen kann.	14q21.3-q22.1	1.92	12588	6756
Stoffwechsel									
	31	NM_015958.1	LOC51611	CGI-30 protein	Dipthine synthase und Methyltransferase.	1p21.2	1.67	7739	4726
	32	NM_000847	GSTA3	Glutathione S-transferase A3	Metabolismus von reduzierter Glutathione, damit anti-Kanzerogen und Mutagen.	6p12.1	5.00	1557	135
	33	NM_002633.1	PGM1	Phosphoglucomutase 1	Regulation von zellulärer Glukosemobilisierung und Energiehomöostase.	1p31	2.22	22301	10170
	34	BC006229.1	CYC5b	Cytochrome c oxidase subunit Vb	Terminales Enzym der mitochondrialen Atmungskette.	2cen-q13	2.00	17780	9105
	35	NM_001862.1	COX5B	Cytochrome c oxidase subunit Vb	Terminales Enzym der mitochondrialen Atmungskette.	2cen-q13	1.85	26820	14737
	36	NM_002492.1	NDUFB5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex	Untereinheit der NADH:ubiquinone oxidoreduktase (Komplex I).	3q27.1	1.67	18898	11821
	37	NM_021122.2	FACL2	Fatty-acid-Coenzyme A ligase	Rolle in Lipidbiosynthese und –degradation.	4q34-q35	2.50	39142	15864
	38	BC005270.1	ND4FS4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4	Untereinheit der NADH:Ubiquinon- Oxidoreduktase der mitochondrialen Atmungskette, ATP-Synthese.	5q11.1	1.85	10920	5956
	39	NM_001867.1	COX7C	Cytochrome c oxidase subunit VIIc	Untereinheit der mitochondrialen Atmungskette, katalysiert den Elektronentransfer vom reduzierten Zytocrom C zu Sauerstoffatomen.	5q14	2.17	55286	26201
	40	BC003674.1	NDUFA2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex	Enzym der mitochondrialen Atmungskette, involviert in zellulärer ATP-Synthese.	5q31	1.67	9562	5854
	41	NM_014402.1	QP-C	Low molecular mass ubiquinone-binding protein	Oxidoreduktaseaktivität. Ubiquinol-cytochrome c Reduktase.	5q31.1	1.69	32210	19064
	42	BC001917.1	MDH2	Malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	Enzym des Zitratzyklus, oxidiert Malat zu Oxaloazetat.	7p12.3-q11.2	1.30	24490	19165
	43	NM_002489.1	NDUFA4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex	Enzym der mitochondrialen Atmungskette, involviert in zellulärer ATP-Synthese.	7p21.3	1.59	22038	14006
	44	NM_005004.1	NDUFB8	NADH dehydrogenase	Enzym der mitochondrialen Atmungskette, involviert in zellulärer ATP-Synthese.	10q23.2-q23.33	1.41	25375	18105

Anhang

			(ubiquinone) 1 beta subcomplex					
45	NM_004074.1	COX8	Cytochrome c oxidase subunit VIII	Terminales Enzym der mitochondrialen Atmungskette.	11q12-q13	1.37	21360	15941
46	NM_004549.1	NDUFC2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1	Enzym der mitochondrialen Atmungskette, involviert in zellulärer ATP-Synthese.	11q13.4	1.59	33921	21642
47	AF042165	COX7CP1	Cytochrome c oxidase subunit VIIc	Terminales Enzym der mitochondrialen Atmungskette.	13q14-q21	2.08	40375	19940
48	NM_001861.1	COX4	Cytochrome c oxidase subunit IV	Terminales Enzym der mitochondrialen Atmungskette.	16q22-qter	1.25	54196	44561
49	L47162.1	FALDH	Human fatty aldehyde dehydrogenase	Abbau giftiger Aldehyde durch Peroxidation.	17p11.2	2.50	16420	6898
50	NM_000382.1	ALDH3A2	Aldehyde dehydrogenase 3 family	Abbau giftiger Aldehyde durch Peroxidation.	17p11.2	3.33	19513	5867
51	NM_021074.1	NDUFV2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2	Enzym der mitochondrialen Atmungskette, involviert in zellulärer ATP-Synthese.	18p11.31-p11.2	1.82	20847	11262
52	M22865.1	CYb5	Human cytochrome b5	Terminales Enzym der mitochondrialen Atmungskette.	18q23	3.57	36175	11654
53	M22976.1	cyt b5	Human cytochrome b5 , 3 end	Terminales Enzym der mitochondrialen Atmungskette.	18q23	3.70	22288	6090
54	NM_001914.1	CYB5	Cytochrome b-5	Terminales Enzym der mitochondrialen Atmungskette.	18q23	3.33	31694	10220
55	NM_013387.1	HSPC051	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex	Oxidoreduktaseaktivität und Ubiquinol-cytochrome c Reduktaseaktivität.	22cen-q12.3	1.43	15592	11200
56	NM_001866.1	COX7B	Cytochrome c oxidase subunit VIIb	Enzym der mitochondrialen Atmungskette, katalysiert den Elektronentransfer von reduziertem Cytochrom C auf Sauerstoffatome.	Xq13.3	1.37	29860	21796
57	NM_004541.2	NDUFA1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex	Bestandteil des mitochondrialen Komplex 1 der Atmungskette, in dem Elektronen von NADH auf Ubiquinon übertragen werden.	Xq24	2.27	25486	11413
Zellkomuni-kation								
58	BC002669.1	NR2	Nuclear receptor subfamily 2	Gen kodiert wahrscheinlich für einen nukleären Hormonrezeptor mit Homologie zum Glukokortikoid- oder Thyroid-hormon-(T3) Rezeptor.	19p13.1	1.51	7213	4917
59	NM_004182.1	UXT	Ubiquitously-expressed transcript	Transkriptioneller Koaktivator des Androgenrezeptors nach Interaktion mit dessen N-terminus.	Xp11.23-p11.22	1.59	11609	7489

Anhang

	60	M92439.1	LeuP	Human leucine-rich protein	Aktivierung von MDR1 und MVP, 2 Schlüsselkomponenten der zellvermittelten Immunabwehr.	2p21	1.92	6429	3379
Adhäsion									
	61	NM_006893.1	LGTN	Ligatin	Moduliert Zell-Zell-Interaktionen, intrazelluläre Adhäsion und Membranproteinbindung. Relevant in Neuroplastizität.	1q31-q32	1.70	9444	5566
	62	M80927.1	CHI3L1**	Human glycoprotein -39	Bestandteil der extrazellulären Matrix. Zuckerbindungskapazität und Hydrolaseaktivität.	1q32.1	7.69	31265	5550
	63	NM_015717.1	LANGERIN	Langerhans cell specific c-type lectin	Expression spezifisch auf Langerhans-Zellen, den unreifen Dendritischen Zellen der Epidermis und Mucosa.	2p13	4.00	4586	1323
	64	NM_007234.2	DCTN3	Dynactin 3 (p22)	Intrazelluläres Transportprotein, z.B. ER-nach-Golgi Transport, zentripetaler Bewegung der Lyso- und Endosomen, Chromosomspindelformation.	9p13	1.45	13690	9694
	65	NM_018663.1	LOC55895	Peroxisomal membrane protein	Peroxisome-Formation und Biogenese.	12q24.33	3.45	6928	2170
Detoxifikation									
	66	NM_001512.1	GSTA4	Glutathione S-transferase A4	Metabolisierung aktiver elektrophiler Zellgifte.	6p12.1	1.41	25838	18009
	67	NM_004528.1	MGST3	Microsomal glutathione S-transferase 3	Produktion von bioaktiven Entzündungsmediatoren Leukotrien und Prostaglandin E.	1q23	1.96	22933	12007
	68	NM_002413.1	MGST2	Microsomal glutathione S-transferase 2	Katalysiert die Konjugation von Leukotrien A4 zu Leukotrien C4.	4q28.3	1.82	10888	6065
	69	NM_015917.1	LOC51064	Glutathione S-transferase subunit 13 homolog	Glutathione-transferase.	7	1.75	9422	5458
	70	NM_001752.1	CAT	Catalase	Zerstörung freier Peroxidradikale. Katalysiert die Degradation von H ₂ O ₂ zu H ₂ O und molekularem Sauerstoff.	11p13	1.61	27669	17923
	71	L19185	NKEFB ^{n.s.}	Human natural killer cell enhancing factor	Reduziert Hydrogenperoxide und Alkylhydroperoxide.	19p13.2	2.50	39723	17286
Unbekannt									
	72	NM_016098.1	LOC51660	HSPC040 protein	Unbekannte Funktion.	6q27	3.33	15481	4682
	73	AL356115	KIAA1128	KIAA1128 protein	Unbekannte Funktion.	10q23.2	1.38	126962	93488
	74	AK022248	FLJ12186	FLJ12186	Unbekannte Funktion.	14q22.3	1.38	15261	11116

Anhang

75	NM_004868.1	GPSN2	Glycoprotein, synaptic 2	Unbekannte Funktion.	19p13.12	1.69	19830	11888
76	AF151056.1	HSPC222	HSPC222	Unbekannte Funktion.	unbekannt	1.59	40513	26566